Aus der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. Dietrich Plester

QUALITATIVE UND QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER SERUMPROTEINE DES PAROTISSPEICHELS GESUNDER INDIVIDUEN DURCH DISC-LAURELL-ELEKTROPHORESE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

ALBRECHT REGENBOGEN
aus
HORB

1977

Aus der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. Dietrich Plester

QUALITATIVE UND QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER SERUMPROTEINE DES PAROTISSPEICHELS GESUNDER INDIVIDUEN DURCH DISC-LAURELL-ELEKTROPHORESE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

ALBRECHT REGENBOGEN
aus
HORB

1977

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. H.-E. Hoffmeister
Berichterstatter: Professor Dr. H. Breuninger

Resch-Druck 7402 Kirchentellinsfurt

M E I N E N E L T E R N

I N D A N K B A R K E I T

Inhalt

1. Einleitung

1.1 Kurze Einführung in die Anatomie, Histologie und Physiologie der Parotisdrüse - Aufgaben des Speichels

1.2 Vorbetrachtung über die Entwicklung der elektrophoretischen Analyse des Speichels - qualitativ und quantitativ
Vorteile der Disc-Elektrophorese und ihrer Modifikation als Mikrodisc und Disc-Laurell-Elektrophorese

2. Anwendung des Verfahrens - Material und Methoden

2.1 Speichelgewinnung

2.2 Vorbehandlung und Konzentration des Speichels

2.3 Disc-Laurell-Elektrophorese

2.4 Laurell-Immun-Elektrophorese

2.5 Materialien und ihre Verarbeitung

2.5.1 Stammlösungen für die Disc-Elektrophorese

2.5.2 Gelzusammensetzung

2.5.3 Lösungen für die Laurell-Elektrophorese

3. Ergebnisse

3.1 Erstellen der Eichkurven

3.2 Qualitative Bestimmung der Serumproteine im Parotissekret

3.3 Quantitative Bestimmung der Serumproteine im Parotissekret

3.4 Abhängigkeit der Proteinkonzentration von der Fließrate

4. Diskussion

5. Zusammenfassung

6. Literaturnachweis

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523707_0082

1. Einleitung

Die Sekrete menschlicher Speicheldrüsen als Mischspeichel, wie auch als Reinsekret der Glandulae submandibularis und parotis waren schon oft Anlaß analytischer Untersuchungen.

Schwerpunkt der Forschungsbemühungen ist dabei die Glandula parotis als bedeutendste Speicheldrüse.

Die Untersuchungen befassen sich einmal mit der Analyse des Sekretes an sich - mit verschiedensten Methoden und Zielsetzungen -, sodann aber auch mit der Beeinflussung der Sekretzusammensetzung durch äußere Faktoren, wie z. B. Reizzustand und Tageszeit. Ein weiterer bestimmender Faktor ist die Fließrate, die selbst wiederum in Abhängigkeit von äußeren Einflüssen gesehen werden muß. Die Berücksichtigung dieser Gesichtspunkte ist auch für eine rein analytische Arbeit von nicht zu unterschätzender Bedeutung, da die Ergebnisse einer Untersuchung letztlich entscheidend durch solche Faktoren beeinflußt, oder gar grundlegend geprägt werden können.

Umfangreiche Forschungen zur Klärung der Einflußnahme der Fließrate u. a. auf die Proteinkonzentration des Parotisspeichels wurden von DAWES (1967, 1969, 1974) und WINDELER, SHANNON (1966, 1967) durchgeführt; DAWES zog gleichzeitig die Auswirkung der Stimulationsdauer in Betracht. Derselbe Autor zeigte 1972 (Zitat) die Einflußnahme einer vorausgegangenen Stimulation auf die Proteinkonzentration des Parotisspeichels auf; mit Einflüssen unterschiedlicher Stimulationsbedingungen auf die Proteine

des Submandibularisspeichels beschäftigte sich CALDWELL (1966). Auswirkungen von Lebensalter, Geschlecht und auch Tageszeit auf die Proteine des Parotisspeichels bzw. der großen Kopfspeicheldrüsen wiesen MEYER, VOGT, KLEBER (1973); MEYER und SCHNEIDER (1975), sowie VOGT und SEMMANN (1970) nach. Ob ein täglicher Rhythmus in Fließrate und Sekretzusammensetzung des Parotisspeichels besteht, versuchten FERGUSON et al. (1973) und im selben Jahr DAWES und ONG zu klären.

Die Fließrate der Speicheldrüsen kann, wie bereits zuvor angedeutet, äußeren Einflüssen unterliegen; folgende Beziehungen wurden untersucht: Licht und Dunkelheit SHANNON et al. (1972, 1973) - Temperatur der Umgebung, Kauwirkung LOURIDIS et al. (1970).

Mit den Auswirkungen der Schwangerschaft auf Fließrate und Sekretzusammensetzung des Parotisspeichels beschäftigten sich SCHÜBEL (1971) und HUGOSON (1972).

Zusammenhänge zwischen Fließrate des Parotisspeichels und Geschmacksorgan werden in den Untersuchungen von ERICSON (1971) und SPEIRS (1971) deutlich.

BENEDEK-SPAET (1973 a, b) führte eine vergleichende Untersuchung der Zusammensetzung stimulierten und unstimulierten Parotissekretes durch.

1.1 Kurze Einführung in die Anatomie, Histologie und Physiologie der Parotisdrüse - Aufgaben des Speichels

Die Glandula parotis ist die größte Mundspeicheldrüse; sie ist, wie aus dem Namen zu schließen, neben dem Ohr lokalisiert. Man unterscheidet nach WALDEYER (1970) einen dünnen, oberflächlich liegenden Lobus colli mit enger topographischer Beziehung zum hinteren Teil des Massetermuskels, zu Unterkieferast und Kiefergelenk, sodann den Lobus retromandibularis, der in der gleichnamigen Fossa liegend den Hauptteil der Drüse darstellt. Vom Vorderrand des Lobus colli geht der Ausführungsgang Ductus parotideus ab, verläuft ungefähr 1 cm unterhalb des Jochbogens über den Masseter, durchsetzt den Buccinator und mündet auf der Papilla parotidea gegenüber dem 2. Oberkiefermolaren im Mundvorhof. Als bedeutendste anatomische Strukturen durchsetzen die Arteria carotis externa und der Nervus facialis die Drüse.

Histologisch ist die Parotis eine rein seröse, zusammengesetzte Speicheldrüse mit gut entwickelten Ausführungsgangsystem, bestehend aus sogenannten Schaltstücken (= Sekretrohr - Ausführungsgang) und Streifenstücken (= Sekretrohre). Im inter- und intralobulären Bindegewebe treten zahlreiche Fettzellen auf, die sich bei zunehmender Involution der Drüse vermehren.

Physiologisch anatomisch liegt der Speichelsekretion ein bedingter Reflex zugrunde, dessen zentripetale Bahn von den Geschmacksrezeptoren der Zunge ausgehen, via Chorda tympani, Ganglion geniculi, Tractus solitarius, Nervus trigeminus und Nervus glossopharyngeus die Nuclei salivatorii des Rautenhirns erregen. Die parasympathisch

sekretorischen Fasern werden hingegen über den Nervus tympanicus (Glossopharyngeus) zum Nervus petrosus minor, Ganglion oticum, Nervus auriculotemporalis und Nervus facialis der Drüse zugeführt. Die ebenfalls vorhandene Sympaticusinnervation tritt in ihren Auswirkungen gegen die oben genannten Einflüsse weitgehend zurück.

S. RAUCH (1959) faßt die 5 folgenden Funktionen des Speichels zusammen:

1. Digestive Funktion : Spülspeichel (Parotis), Gleitspeichel (Submandibularis- und Sublingualisdrüse), - Verflüssigung der Nahrung als Grundbedingung für den fermentativen Aufschluß - Befeuchten der Schleimhäute: Gustation, Deglutition, Phonation. - Durch Verhütung von Austrocknung Schutz vor Sekundärinfektionen - schließlich die enzymatische Aktivität durch z. B. Amylase.

2. Exkretorische Funktion : mit Ausscheidung spezifischer drüseneigener Produkete (z. B. Eiweiß), sowie allgemeiner, körpereigener Stoffe (z. B. Ammoniak, Harnstoff, Zucker, Blutgruppensubstanzen), sodann die Ausscheidung körperfremder Stoffe (Anorganika, Medikamente und ihre Abbauprodukte).

3. Dentotrope Funktion : Diffusion Speichel ⇐⇒ Zahnschmelz im Sinne von z. B. De- und Remineralisationsvorgängen durch Kalzium-, Phosphat-, Fluor- und Hydroxylionen.
Zahnzerfall bei fehlenden Speicheldrüsen bzw. bei fortgeschrittener Involution.

4. Hormonale und humorale Funktion : sie ist erwiesen durch die physiologische Korrelation von Speichel- und Magensaftsekretion.

5. Antiinfektiöse Abwehrfunktion des Gesamtspeichels : bedingt durch
   a) mechanische Faktoren Nahrungsaufnahme, Schluckakt, Reduktion der Flora
   b) zelluläre Elemente wie Macrophagen und Lymphozyten
   c) humorale anorganische Faktoren wie die oligodynamische Wirkung durch Kalzium, Eisen, Silber und Halogene
   d) humorale organische Faktoren: sogenannte Mutine

1.2 Vorbetrachtung über die Entwicklung der elektrophoretischen Analyse des Speichels - qualitativ und quantitativ

Definition der Elektrophorese:

Unter Elektrophorese versteht man die Trennung von Proteinen in einem Trennsystem bestehend aus Trägermedium, Lösungsmittel (= Pufferlösung) und elektrischem Feld entsprechend ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit. Die elektrophoretische Beweglichkeit ist als Wanderungsgeschwindigkeit je Feldstärkeeinheit definiert.

Seit Beginn der 50er Jahre hat das Trägermedium Papier in der Papierelektrophorese zur Analyse vieler Körpersekrete wie z. B. Serum und Speichel Anwendung gefunden. Die Papierelektrophorese beruht auf der Kombination der Prinzipien von Papierchromatographie und Elektrophorese (Rapoport (1969). Sie war bis ungefähr 1965 das gängigste Trennungsverfahren für Proteine von Misch- und Drüsenspeichel.

GELLER, HAMES, ROVELSTAD (1959) untersuchten Parotis- und Mischspeichel, sowie ein Speichelgemisch, das frei von Parotisspeichel war durch "moving boundery electrophoresis", in enger verfahrenstechnischer Anlehnung an Tiselius. Im Parotisspeichel fanden sich 5 Fraktionen; im Mischspeichel hingegen nur 3. Insgesamt gesehen wurden 6 verschiedene Fraktionen erkannt, die im Vergleich ihrer Wanderungsgeschwindigkeit zu entsprechenden Stoffen als Muzin, Albumin, α, β , γ -Globulin und Lysozym bezeichnet wurden.

Bei der Analyse von Parotisspeichel durch HARNDT (1960) wurden 6 Proteinfraktionen dargestellt, außerdem ein Vergleich zu den Proteinfraktionen des Serums durchgeführt.

WEINSTEIN, HESKINS und JACKSON (1960) trennten im gleichen Jahr 11 Fraktionen - MANDEL und ELLISON (1961) 6 bis 8 Fraktionen. Durch eine im Anschluß an die Papierelektrophorese durchgeführte Immunelektrophorese nach SCHEIDEGGER (1953) konnten Albumin, sowie α , β , γ -Globulin qualitativ identifiziert werden.

In der durch SOLENOVA (1966) erstellten Papierelektrophorese des Parotissekretes wurden 4 bis 12 Fraktionen beobachtet, wovon 2 bis 4 zur Anode und 2 bis 8 zur Kathode wanderten. In 80,7 % der Fälle (von 137) traten 5 bis 7 Banden auf.

ZIPPEL, MEYER, SCHUBEL und BIETZ (1969) isolierten im Vergleich zwischen verschiedenen Stimulationsmethoden (Pilocarpin, Zitronensaft) 6 Fraktionen.

Eine Papierelektrophorese des Gesamtspeichels erfolgte durch FISCHER, WYSHAK und WEISBERGER (1962). Bei nicht dialysiertem Gesamtspeichel konnten 5 bis 6, nach Elektrodialyse 11 Banden unterschieden werden. - MASSEN (1965) wies durch verschiedene Antiseren gegen menschliche Serumproteine Albumin und Transferrin im Mischspeichel qualitativ nach.

Eine Weiterentwicklung obigen Verfahrens stellt die sog. Dauerfluß-Papierelektrophorese von APOSTOPOULOS (1967) dar: 12 Proteinbanden im Mischspeichel.

Durch Kombination von Celluloseacetat und Agargel-Elektrophoresen trennten D'SILVA und FERGUSON (1962) 17 Fraktionen. MEYER et al. (1972) isolierten in ähnlichem Verfahren (CAFE) wiederum im Vergleich zwischen Stimulation durch Pilocarpin und Zitronensaft 7 Fraktionen.

MARTINA (1968) schloß seiner Trennung von Gesamtspeichel auf Celluloseacetat eine Immunelektrophorese nach SCHEIDEGGER (1955) an. Mit Kaninchenantiserum wurden Albumin, α_1 -Antitrypsin, Siderophyllin, sowie IgA und IgG qualitativ nachgewiesen. Transferrin wurde auch quantitativ bestimmt.

Vergleichende Untersuchungen von Speichel und Serumproteinen wurden von BERNARDINI (1971 a) durch Säulenchromatographie an Sephadex G 200 angestellt. Aus der Ähnlichkeit des Trennungsprofils von Speichel und Serumeiweißen schlossen die Autoren auf die Anwesenheit größerer Mengen Serumproteine im Speichel. Weitere Untersuchungen derselben Autoren (1971 b) trennten Proteine von menschlichem Mischspeichel auf saurer DEAE-Cellulose (Diäthyl-amino-äthyl-cellulose) und CM-Cellulose. Im Anschluß daran wurde eine Polyacrylamidgel-Elektrophorese durchgeführt.

Mit der Einführung der Polyacrylamid-Disc-Elektrophorese durch MUUS und VNENCHAK (1964) wurde ein neues Kapitel in der Proteinanalyse von Speichel eröffnet. Sie trennten durch dieses Verfahren Speichelamylase in 4 Iso-Enzymbanden. Die erste systematische Anwendung zur Proteinanalyse menschlichen Speichels erfolgte durch CALDWELL und PIGMAN (1965). 18 bis 21 Fraktionen konnten aus Submandibularisspeichel isoliert werden. Vergleichend wurde auch Parotis- und Mischspeichel analysiert; hierbei liessen sich deutliche qualitative und quantitative Unterschiede beobachten (Bandenzahl, Bandenbreite).

MEYER und LAMBERTS untersuchten noch im gleichen Jahr Parotisspeichel von Einzelindividuen, sowie ein Gemisch

von mehreren Probanden; die Elektrophorese wurde auf horizontalen Acrylamidgelstreifen durchgeführt.

Durch disc-elektrophoretische Trennung auf Flachgelen unter Einsatz saurer und alkalischer Pufferlösungen, sowie Anfärbung durch Amido-Schwarz und Coomassie Brilliant Blue fanden sich 19 und 30 Fraktionen im Parotisspeichel (1 Proband, STEINER und KELLER (1968).

Das Verfahren der Färbung mit Coomassie Brilliant Blue war, nachdem es sich schon auf anderen Trägermedien wie Papier und Stärke bewährt hatte, von MEYER und LAMBERTS (1965) erstmals zur Färbung elektrophoretischer Trennungen auf Acrylamid eingeführt und für gut befunden worden. Durch die hohe Empfindlichkeit konnten auch Banden nicht konzentrierter Proben nach Färbung unterschieden werden.

Dieselben Autoren (1968) wandten auch das Färbemittel Wool Fast Blue BL zur Untersuchung von Proteinen nach Trennung in Acrylamidgel an. MEYER und LAMBERTS hoben die Schärfe der Darstellung im sauren wie alkalischen Bereich wie auch die Farbstabilität hervor.

Die Untersuchungen von PINI PRATO (1969) ließen nach Trennung von Submandibularis- und Parotisspeichel (und Mischspeichel) bei pH 4,5 15 und 12 Fraktionen erkennen. - Im selben Jahr untersuchte PINI PRATO in enger Anlehnung des Verfahrens an ORNSTEIN und DAVIS (1959) Mischspeichel: Die Elektrophorese erfolgte im anionischen (pH 8,3) und kationischen (pH 4,5) Bereich unter Verwendung von Gelen mit und ohne Harnstoff. Bei der kationischen Trennung unter Harnstoff konnten 12 Proteinbanden dargestellt werden. Derselbe Autor (1970) wies unter gleichen Versuchsbedingungen eine hohe Ähnlichkeit bestimmter Banden beim Vergleich Serum/Mischspeichel nach.

Parotis-, Submandibularis- und Mischspeichel eines Probanden trennte BEELEY (1969) durch isoelektrische Fokusierung. 18 bis 20 Fraktionen waren jeweils enthalten. Nicht entsalzter Speichel ergab unscharfe Banden; durch Amicon Ultrafiltration konnte dieser Umstand befriedigend beseitigt werden.

In den Untersuchungen von BELLAVIA (1971) waren bei 40 gesunden Probanden beiderlei Geschlechts im Parotisspeichel durchschnittlich 14 Fraktionen nachweisbar. Es wurden nur anodisch wandernde Banden untersucht; geschlechtsbedingte Unterschiede waren nicht festzustellen. Die Ergebnisse der Analyse von Proben eines Spenders waren nach kürzerem (1 Woche) und nach längeren Intervallen (6-12 Monate) gut reproduzierbar. BELLAVIA empfiehlt sein Verfahren für klinische Untersuchungen und Reihenuntersuchungen größerer Gruppen.

Das Verfahren der isoelektrischen Fokusierung wurde von ARNEBERG (1972) erneut aufgegriffen. Der pH-Bereich von pH 3 - 10 enthielt 4 Proteinfraktionen; darunter Amylase und Lysozym.

SMITH, RUNCHEY und SHAPIRO (1974) trennten Parotisspeichelproteine von 26 weiblichen und 26 männlichen Individuen in einem speziellen Polyacrylamid-Gel-Scheiben-Elektrophorese-Apparat. Die Zahl der Banden je Probe schwankten zwischen 15 und 24. Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen Probanden konnten nicht festgestellt werden. Bei strenger Einhaltung der Vorbehandlungsmaßnahmen der Proben waren die Einzelergebnisse bis auf geringe quantitative Schwankungen reproduzierbar. Die großen individuellen Unterschiede wurden auf biologische Abweichungen zurückgeführt.

Um die Herstellung von Normal-Disc-Elektrophorogrammen des menschlichen Parotisspeichels bemühten sich MEYER und KLEBER (1975 a) mit der Untersuchung von 67 Probanden. Die Analyse erfolgte im sauren wie alkalischen Trennsystem. Die Banden wurden jeweils entsprechend ihres Rf-Wertes (Definition: Wanderungsstrecke der Proteinbande zur Gesamtstrecke) auf dem Trenngel lokalisiert. Mit Hilfe dieser erstellten Normen sollten Abweichungen von pathologischem Speichel deutlich werden.

In einer weiteren Arbeit (1975 b) nahmen obige Verfasser Stellung zur quantitativen Verteilung von Proteinfraktionen vor und nach gustatorischer Stimulation. Die Disc-Elektrophorese erfolgte wiederum im sauren und alkalischen Polyamidgelsystem. Sie bemühten sich als erste diesen Untersuchungen auch quantitativen Charakter zu verleihen. Die quantitativen Bestimmungen der einzelnen Proteinbanden erfolgte durch Mikrodensitometrie. Dem Mikrodenistometer waren ein Integrator und Kompensationsbandenschreiber angeschlossen. Es wurde lediglich der prozentuale Anteil der Einzelpeaks an der Gesamtabsorption bestimmt; absolute Mengenangaben pro Speichelvolumen wurden nicht veröffentlicht. Diese quantitativen Untersuchungen machten deutlich, daß eine signifikante Veränderung der Trennungen vor und nach gustatorischer Stimulation, im sauren, wie alkalischen Trennsystem nicht gegeben ist.

Eine weitere deutschsprachige Autorengruppe, die sich in jüngerer Vergangenheit intensiv um die Untersuchung des Parotissekretes durch moderne Elektrophoreseverfahren bemüht hat, sind MÜNZEL und EICHNER (1974). Bei 30 Normalprobanden enthielten die disc-elektrophoretischen Trennun-

gen durchschnittlich 14-16 Fraktionen. Bei Ruhesekretion, Stimulation durch Ascorbinsäure und Pilocarpin konnten durch direkte Densitometrie positive und negative Schwankungen der Qualität einzelner Proteinfraktionen sichtbar gemacht werden. Bestimmte Banden waren bei Stimulation verstärkt, andere geschwächt. Das Verfahren ist gut reproduzierbar.

In der nachfolgenden Arbeit führten EICHNER, MÜNZEL und BRETZEL ähnliche densitometrische Vergleichsbestimmungen der Banden bei chronologisch aufeinander folgender Ruhe-, Reiz- und Ruhephase durch. Durch Pilocarpin wurde die Parotisdrüse in einen höheren Reizzustand versetzt als durch Ascorbinsäure. Als weitergehende Untersuchung wurden Glycoproteine durch Färbung nach Zacharias nachgewiesen; sodann auch die Fließratenabhängigkeit von Ca^{++}, Na^{+} und K^{+} aufgezeigt. Bei Ruhe- und Reizsekret wurden, wie schon oben angedeutet, Muster von Parotisproteinbanden sichtbar, die bei den Versuchspersonen unabhängig von Alter, Geschlecht und Zeitpunkt der Abnahme voll reproduzierbar waren.

Um weiterführende Forschungen auf dem Gebiet der Speichelproteine bemühten sich BENNICK und CONNELL (1971). Basierend auf einer Trennung durch Polyacrylamidgelelektrophorese überprüften sie den Reinheitsgrad bei 4 Fraktionen des Parotissekretes durch erneute Elektrophorese auf Polyacrylamid bei variierendem pH, durch isoelektrische Fokusierung, Immunodiffusion und Sedimentation in der Ultrazentrifuge. Enzymatische Teste sowie Kreuzreaktionen mit spezifischen Antiseren für Lactoferrin und 15 Serumproteine zeigten keine positive Reaktion.

OPPENHEIM und HAY (1972) identifizierten nach einer Disc-Gel-Elektrophorese von Gesamtspeichel Speichelalbumin aufgrund der identischen elektrophoretischen Beweglichkeit beim Vergleich mit einer Elektrophorese von Serumalbumin, sowie durch immunoelektrophoretischen Nachweis. (Das Elutionsvolumen nach säulenchromatischer Auftrennung an Sephadex G 200 war ebenfalls identisch.)

Nach Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese von Parotissekret nach DAVIS (1964) unterzogen BELLAVIA et al. (1972) die 4 anodenfernsten Fraktionen folgendem immunologischen Reaktionstest. Bei Immunodiffusion durch IgA-Serum vom Kaninchen zeigte sich, daß die letzten 3 Fraktionen IgA-ähnlichen Antigencharakter hatten. Diese Feststellung wurde dadurch untermauert, daß die Reaktion zwischen Kaninchen-Antihumanserum IgA und roten Blutkörperchen, die mit Antihumanserum sensibilisiert waren, durch die Eluate der letzten 3 Banden unterbunden wurden.

LEVINE/ELLISON (1973) verglichen bei einem Probanden eine Zonenelektrophorese in Polyacrylamid mit einer Immunelektrophorese durch Anti-Parotisspeichel-Serum von Ziegen und Antihumanserum von Kaninchen. Die Polyacrylamid-Flach-Elektrophorese zeigt im anionischen und kationischen Bereich zusammen 17-18 Fraktionen. Durch die Immunelektrophorese durch Anti-Parotisspeichel-Serum ließen sich 12 Antigene erkennen. Nach weiterer chromatographischer Auftrennung auf DEAE-Cellulose konnten Amylase, IgA, Albumin und ein Parotisglycoprotein identifiziert werden. Die

einzelnen Fraktionen nach DEAE-Cellulose-Chromatographie wurden einer quantitativen Bestimmung nach Lowry unterzogen. Die Autoren geben einen umfassenden literarischen und tabellarischen Überblick über den Stand der Analyse des Parotissekretes.

Anhand dreier verschiedener Methoden zur Proteindifferenzierung versuchten EICHNER, MÜNZEL, BRETZEL und HOCHSTRASSER (1975) die Identifikation verschiedener Proteinbestandteile des Parotissekretes. Durch eindimensionale Immunelektrophorese nach SCHEIDEGGER (1955) waren bei Anwendung von Antihumanserum Immunglobulin A und Albumin nachweisbar; bei der Reaktion mit Parotissekret-Antiserum vom Kaninchen wurden 7 Präzipitationslinien sichtbar, darunter IgA, Transferrin und Amylase. Bei den restlichen 4 Fraktionen handelt es sich um spezifische Speichelproteine.

Bei der Immunodiffusion nach OCHTERLONY (1958) wurden durch monospezifische Antiseren deutliche Präzipitationen mit IgG und Albumin sichtbar.

Unter Einbeziehung quantitativer Aspekte stellt die zweidimensionale Immunelektrophorese nach LAURELL das Verfahren der Wahl dar. Bei der Präzipitationsreaktion mit Antihumanserum wurden 5 Peaks deutlich. Qualitativ handelt es sich um IgA, IgG und Albumin. Die restlichen Peaks konnten nicht identifiziert werden. Unter Verwendung von Parotissekretprotein-Antiserum vom Kaninchen wurden erkennbar: Bereich der γ ,α_1 ,α_2 -Globuline, sodann 4 Peaks im β - Globulinbereich = Isoamylasen; IgA ist ebenfalls nachweisbar. - Eine absolute quantitative Aussage erfolgt nicht! Die Autoren stellen lediglich individuelle Schwankungen, erkennbar an der Peakhöhe, fest.

Aus den vorangegangenen Darstellungen der einzelnen Analyseverfahren ist deutlich zu erkennen, daß die elektrophoretische Trennungen mit Celluloseacetat und Polyacrylamid ein größeres Auflösungsvermögen und eine höhere Reproduzierbarkeit gegenüber dem Trägermedium Papier besitzen. Der Grund hierfür liegt im sog. Molekularsiebeffekt durch den Gele als Elektrophoreseträger im kontinuierlichen, homogenen System die Trennung maßgeblich beeinflussen. Es sind also nicht nur durch die Ladungsverhältnisse und die daraus resultierende elektrophoretische Beweglichkeit eines Moleküls, sondern auch seine Größe und Gestalt (Molekulargewicht und Tertiärstruktur) entscheidend für die Fortbewegung auf dem Trägermedium.

Der Begriff Disc-Elektrophorese (ORNSTEIN und DAVIS 1959, 1964) beruht auf Diskontinuitäten in pH-Wert, Puffer- und Gelporenunterschieden innerhalb der Gelsäule. Sie erzeugen den Konzentrationseffekt, der zusammen mit dem Molekularsiebeffekt für die hohe Auflösung dieses Verfahrens verantwortlich ist. Diese Gelporenunterschiede sind bestimmt durch den Polymerisations- und Vernetzungsgrad der Grundstoffe Acrylsäureamid und N,N'-Methylenbisacrylsäureamid.

Die Vorteile des Trägermediums Polyacrylamidgel sieht MAURER (1968) in der chemischen Stabilität und Indifferenz, der umfassenden Steuerbarkeit seiner Porengröße, seiner Stabilität gegenüber pH- und Temperaturänderungen, seiner guten Reproduzierbarkeit u. a.

Gegenüber anderen Elektrophoreseverfahren hebt MAURER (1968) den geringen Materialbedarf, den Konzentrierungs-

effekt, den einfachen technischen Aufwand, die kurzen Trennzeiten, das hohe Auflösungsvermögen, die gute Reproduzierbarkeit und nicht zuletzt die vielseitige Anwendungsmöglichkeit hervor.

Als Vorteile der Mikro-Disc-Elektrophorese in Polyacrylamidgelsystemen sind bekannt (MAURER) die Trennungen im Mikro- und Ultramaßstab von 10^{-9} bis 10^{-12} g Protein, bedingt durch die gesteigerte Nachweisempfindlichkeit wegen der kleinen Gelquerschnitte, die Anwendung höherer Feldstärken wegen der besseren Wärmeableitung, die kürzeren Trennzeiten, sowie die verminderte Diffusion, da rasche Fixierung und Färbung möglich.

Die Disc-Laurell-Elektrophorese ist bei GIEBEL und SAECHTLING (1973) als Kombination einer Mikro-Disc-Elektrophorese mit einer Mikro-Antigen-Antikörper-Überwanderungselektrophorese definiert. Nach vollzogener Trennung im Polyacrylamidgel-Zylinder erfolgt die Einbettung in einem horizontalen, antikörperhaltigen Agarosegel. Nach erfolgtem Lauf stellen sich die einzelnen Antigene als Präzipitationspeaks dar (= qualitativer Nachweis). Diese Peaks sind einer quantitativen Bestimmung durch Planimetrie gut zugänglich.

Durch die Kombination beider Verfahren wird zunächst das Serumproteinspektrum aufgeschlüsselt, sodann durch die spezifische Präzipitation der qualitative Nachweis der einzelnen Proteine ermöglicht und gleichzeitig die Möglichkeit für die quantitative Bestimmung durch Planimetrie geschaffen, die der photometrischen Bestimmung auf dem Polyacrylamidgelstreifen überlegen ist. Da das Probevolu-

men sehr klein ist, lassen sich bei diesem Mikro-Disc-Verfahren alle einzelnen Serumproteine aus einer Probe simultan bestimmen.

Die Anwendung dieses vorteilhaften, neuen elektrophoretischen Trennungsverfahrens zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Serumproteinen im Sekret der Parotisdrüse soll Sinn, Zweck und Zielsetzung dieser Arbeit sein.

Es gilt fernerhin die Tauglichkeit obigen Verfahrens bei der Anwendung auf das Körpersekret Speichel unter Beweis zu stellen.

2. Anwendung des Verfahrens Material - Methoden

2.1 Speichelgewinnung

Bei 20 männlichen Probanden im Alter von 21 - 28 Jahren, deren Speicheldrüsen klinisch gesund waren, wurde Parotissekret nach Belieben entweder der rechten oder linken Drüse entnommen. Zur Stimulation verwandten wir Zitronensaft der Marke Sunkist-Lemon-Juice, der den Probanden auf die geschmacksempfindlichen Partien der Zunge gespritzt wurde. Der Ausführungsgang der Parotisdrüse wurde mit einem Polyvinylkatheter, dessen craniales Ende durch eine abgerundete Einmalkanüle Größe 1 verstärkt worden war, auf eine Tiefe von ca. 15 mm sondiert. In einem Entnahmezeitraum von 4-10 Minuten konnten pro Spender ca. 3 ml Sekret gewonnen werden. Die durchschnittliche Fließrate lag bei 0,68 ml/Minute. Der gewonnene Parotisspeichel wurde in verschließbaren Reaktionsgefäßen des Mikrolitersystems 38 C der Firma Eppendorf, Hamburg, bei -20 ^{o}C zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

2.2 Vorbehandlung und Konzentration des Speichels

Bevor die Proben der gezielten Untersuchung auf Serumproteine unterzogen wurden, wurden sie in einem Minicon ^{TM}-Concentrator (Firma Amicon B. V., Osterhout, Holland) dialysiert und konzentriert. Eine Zentrifugation fand nicht statt! Als Einsatz im Minicon-Concentrator wurden

je 2 ml = 2000 µl Speichel vorgegeben und in 3 Portionen mit Pasteur-Pipetten in das Minicon-System eingefüllt. Die Ausbeute wurde in Mikro-Cap 50 µl abgemessen. (Firma Drummond Scientic Co; Shandon Labortechnik Frankfurt, Deutschland)
Beispiel der Konzentration an Speichelprobe Nr. 4

Ausbeute

$$\begin{array}{ll} 1 \times 50\ \mu l & \\ 1 \times 25\ \mu l & \text{mit } H_2O \text{ aufgefüllt} \\ \hline 75\ \mu l & \end{array}$$

Bei vorgegebenen 2000 µl Probe wären 20 µl 100-fach konzentriert. Hieraus folgt der Drei-Satz

$$\begin{aligned} 20\ \mu l &\triangleq 100\text{-fach} \\ 75\ \mu l &\triangleq x\text{-fach} \end{aligned}$$

$$x = \frac{20 \times 100}{75} = 26{,}6\text{-fach}$$

Da 2 µl aufgetragen wurden, ist die Probe 4 53,2 fach konzentriert.
Entsprechend obigem Beispiel wurden für die Proben 1-20 folgende Konzentrationen errechnet.

Probe 1	38,8-fach	Probe 6	51,0-fach
Probe 2	53,2-fach	Probe 7	48,8-fach
Probe 3	53,2-fach	Probe 8	53,2-fach
Probe 4	53,2-fach	Probe 9	79,8-fach
Probe 5	26,3-fach	Probe 10	47,1-fach
Probe 11	60,0-fach	Probe 16	60,0-fach
Probe 12	60,0-fach	Probe 17	76,5-fach
Probe 13	60,0-fach	Probe 18	79,8-fach
Probe 14	60,0-fach	Probe 19	79,8-fach
Probe 15	58,2-fach	Probe 20	59,1-fach

2.3 Disc-Laurell-Elektrophorese

Das Verfahren ist identisch mit dem von GIEBEL/SAECHTLING (1973). Das Puffer-System wurde entsprechend wie bei DAVIS (1964) angewandt. Die technische Ausrüstung für das Trennungsverfahren stammte von Fa. Boscamp in Hersel, Deutschland.

Bereiten der Gele aus Polyacrylamid:

Glaskapillaren (Fa. Boscamp) von 10 cm Länge werden auf die Hälfte gekürzt und vom oberen Rand her, nach Aussparung von 5 mm für die Probe, die Markierungen für Sammel-, Trenngel- und Lauffront in je 10 mm Abstand angebracht. Als Sammelgel wurde 2-%iges, als Trenngel 6-%iges Polyacrylamidgel verwandt.

Mit einer Boscamp-Pumpe wird Trenngel über das untere Kapillarenende angesaugt und die Kapillare mit Plastilin (Fa. Boscamp) abgedichtet. Das Trenngel wird von oben her (Pumpe) sorgfältig mit Wasser überschichtet um eine meniskusfreie Trennfläche zum Sammelgel zu erhalten. Nach abgeschlossener Auspolymerisation im Kühlschrank - ca. 1 Stunde - wird das überstehende Wasser bei 1000 U/Minute über 2-3 Minuten abzentrifugiert und mit Rinse-Spüllösung nachgereinigt und erneut wie oben zentrifugiert.

Das Trenngel wird hierauf mit Sammelgel bedeckt, jedoch etwas über die entsprechende Sammelgelmarke hinaus, um den zu erwartenden Polymerisationsschwund zu kompensieren. Die Röhrchen werden bis zum oberen Rand mit Wasser überschichtet und mit Parafilm verschlossen. Über Nacht

erfolgt die Polymerisation im UV-Licht bei 254 ηm. Die so vorbereiteten Trennröhrchen besitzen im Kühlschrank eine Haltbarkeit von ungefähr 1 Woche.

Vor Auftragen der Probe wird das über dem Sammelgel stehende Wasser sorgfältig mit einer Spritze bis auf einen Restspiegel von 1 mm Wasser abgesaugt, da eine Beseitigung des Wassers durch Abzentrifugieren infolge der Viskosität des Sammelgels nicht möglich ist. Der Plastilinpfropf am unteren Ende des Kapillarröhrchens wird abgesägt. Die Probe (1-2 µl) wird mit einer Mikrolitерspritze (Hamilton 7101 N, Mikromessure D. V., The Hague - Holland) in das auf dem Sammelgel verbleibende H_2O eingebracht und mit Tris-Glycin-Puffer 1:10 überschichtet, wobei auf blasenfreie Applikation des Puffers zu achten ist. Die Röhrchen werden erst durch Eintauchen in dem bis in 3 cm Höhe, mit kaltem Tris-Glycin-Puffer (4 °C) gefüllte, untere Elektronengefäß benetzt, dann in den Mikro-Disc-Einsatz eingeschoben und schließlich in das Elektrodengefäß gestellt. Nachdem man die Röhrchenenden mit 0,2 - 0,3 ml einer 1:20 verdünnten Bromphenolblaulösung zur Markierung der Lauffront überschichtet hat, füllt man die obere Kammer des Elektrodengefäßes mit Tris-Glycin-Puffer obiger Konzentration.

Die Spannung wird so angelegt, daß der Stromfluß von oben (-) nach unten (+) erfolgt. Bis die Lauffront (Bromphenolblau) an der Grenze Sammel-, Trenngel angekommen ist, beträgt die Spannung 100 Volt; ab hier, bis zum Ende der Elektrophorese wird auf 300 Volt geschaltet. Sobald die Lauffront das Trenngel durchschritten hat, ist die Elektrophorese beendet.

Zur Entfernung der Gele werden mit einer Ausstoßnadel (Rimmnadel, Fa. Boscamp) vom unteren Ende des Röhrchens her 5 mm herausgequetscht und von unten her mit Paraffin abgedichtet. Unter gefühlvoller Kraftdosierung wird, von der mit Paraffin überkappten Stelle her, das Gel herausgedrückt und im Wasser schwimmend (Petri-Schale) vom Sammelgel abgetrennt. Mit einem Tauchhaken (Fa. Boscamp) kann es nun für die Laurell-Elektrophorese entnommen werden.

2.4 Laurell-Immun-Elektrophorese

Als vorbereitende Maßnahmen für die Laurell-Elektrophorese werden Objektträger der Abmessungen 26x38 mm in Plastikrähmchen mit inneren Abmessungen von 27x40 mm eingefügt. Zuvor war das Glas des Objektträgers an der Unterseite im Abstand von 4-5 mm von der Schmalseite entfernt mit einem Glasschreiber markiert worden. An dieser Marke wird beim Einlegen des Disc-Gel-Streifens der Trenngel lokalisiert. Der Spalt zwischen Objektträger und Rahmen wird mit Agarose ausgegossen. Die überstehende Agarose wird mit einem Skalpell abgetragen, um eine plane Fläche von 27x40 mm zu erhalten. (Agarose 0,8 % in 0,015 M. Veronalpuffer; Aldrich Chemical Co. Inc. Milwaukee, Wiscons.)
Eine schematische Darstellung dieses Versuchsaufbaus zeigt Abbildung 1 (siehe Abbildungsteil Seite 60)

Bereiten der Immun-Agarose-Gele

0,8 %ige Agarose bestehend aus 0,8 g Agarose und 95 ml 0,015 M. Veronal/HCl-Puffer (pH 8,6) werden bis zur kla-

ren Lösung erhitzt und im Wasserbad von 45-50 °C aufbewahrt. Zur Herstellung der Immun-Agarose wird mit vorgewärmten Pipetten obige Agarose mit entsprechendem Antiserum zusammengebracht. Z. B. 0,2 ml Antiserum + 9,8 ml 0,8 %ige Agarose; Aufbewahrung im Wasserbad bei 45-50 °C nach Verschluß mit Parafilm. Mit einer auf 50 °C vorgewärmten Pipette wird 1 ml Antiserum-Agarose auf die durch einen Nivelliertisch (Fa. Boscamp) ausgerichteten Objektträger gleichmäßig aufgebracht. Nach Festigung der Agarose wird mit einem Skalpell im Abstand von 5 mm ein Schnitt parallel zur Schmalseite durch den Gel geführt. In diesem Spalt werden entsprechend der oben beschriebenen Markierung die frisch gerimmten Mikro-Disc-Gele so hineingedrückt, daß ein guter Kontakt zwischen Agarose und Polyacrylamidgel gewährleistet ist.

6-7 Rähmchen werden nun zügig auf den Kühlblock einer Laurell-Kammer (Fa. Boscamp) gebracht. Die Pufferkammer wurde zuvor mit 0,6 M. Veronal/HCl-Puffer gefüllt. Durch Auflegen feuchter Rayon-Dochte (= Pufferlappen; Fa. Gelman Instr. Comp., Ann Arbour, Michigan), die zuvor mit Veronal/HCl-Puffer getränkt und etwas ausgepreßt worden waren, wird die Agarose-Schicht mit den Platinelektroden verbunden. Der Deckel der Laurell-Kammer kann nun geschlossen und eine Spannung von 50 Volt angelegt werden.

Der Minuspol liegt an der Stelle der Agarose-Platte in die der Disc-Streifen eingelegt wurde. Um ein Verdampfen der Agarose zu verhindern, werden nach 1/2 - 1 Stunde unter Abklemmen der Spannung Parafilmstreifen auf die Geloberfläche aufgebracht. Nach einer Laufzeit von 16 Stunden ist die Gewähr gegeben, daß alle Eiweißpeaks auspräzipitiert sind,

d. h. die Elektrophorese ist beendet. Die Parafilmstreifen und Pufferlappen können abgenommen werden. Die Rähmchen werden in physiologischer Kochsalzlösung über ca. 38-48 Stunden gewaschen und anschließend in H_2O dem. gelegt. Die Agarose-Platten können nun dem Rahmen entnommen werden und auf dem Objektträger in einem Trockenrahmen unter aufgelegtem, befeuchtetem Filterpapier trocknen.

Die trockenen Gele werden mit einer Färbeküvette mit 0,25 %iger Coomassie-Brilliant-Blue-Lösung R 250 2 Stunden angefärbt. (Coomassie-Bereitung: In Ampuwa gelöst und mit HCl auf pH 3-4 gebracht.) Bei mehrmaligem Wechsel des Wassers werden die Gele über 5-10 Minuten in H_2O dem. abgespült. Die Proteinpräzipitate heben sich als dunkelviolettblaue Peaks vom bläulichen Hintergrund ab.

In einem vorgegebenen Abbildungsmaßstab (entsprechend der Eichkurvenherstellung) werden die Trennungen mit einem Agepe FF-Film (Agfa Gevaert, Leverkusen) abfotografiert und auf 18x24 Fotopapier abgezogen. Dieser orthochromatische Film hat zwischen 400-500 ηm eine wesentlich höhere Empfindlichkeit als das menschliche Auge. Hierdurch können auf den Abzügen kräftigere Peaks wie auf den Gelen beobachtet werden.

Die quantitative Bestimmung erfolgt durch Umfahren der ungefähr 9 mal vergrößerten Peaks mit einem Planimeter (Fa. Ott, Kempten, Deutschland). Von jeder Probe werden 3-4 Trennungen gemacht, hiervon wird jetzt der Mittelwert bestimmt. Die Umrechnung in mg% Protein erfolgt mit einer Eichkurve, zu deren Erstellung das obige Verfahren mit Seren bekannten Proteingehalts durchgeführt wurde.

2.5 Materialien und ihre Verarbeitung

2.5.1 Stammlösungen für die Disc-Elektrophorese

A 1 n HCl (48,0 ml) / Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (36,3 g) / Tetramethylaethylendiamin (Temed; 0,23 ml) Fa. SERVA, Feinbiochemika, Heidelberg, Deutschland / Aqua dest (ad 100 ml) - pH 8,8 - 9,0

B 1 n HCl (48,0 ml) / Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (5,98 g) / Temed (0,46 ml) / Aqua dest ad 100 ml - pH 6,6 - 6,8

C Acrylamid, 6 % im Trenngel (24 g) Fa. SERVA, Feinbiochemika, Heidelberg, Deutschland / N,N Methylen-bis -acrylamid (0,73 g - BIS) Fa. SERVA / Aqua dest ad 100 ml

D Acrylamid (10 g) / N,N' -Methylen-bis-acrylamid (2,5 g; BIS) / Aqua dest ad 100 ml

E Ribofalvin (4,0 mg) Fa. SERVA / Aqua dest (ad 100 ml)

F Saccharose (40,0 g) Fa. Merck Chemie, Darmstadt, Deutschland / Aqua dest ad 100 ml

G Ammoniumpersulfat (Katalysator ; 140 mg) Fa. SERVA / Aqua dest ad 100 ml (1 Tag vor Gebrauch anzusetzen)

H Tris-Puffer (3 g) Fa. Merck Chemie / Glycin (14,4 g) Fa. SERVA / Aqua dest ad 1000 ml
(vor dem Einfüllen in die Pufferkammer 1/10 verdünnen)

K Zur Markierung der Lauffront gesättigte Bromphenolblaulösung (1,0 ml) Fa. Boscamp / Aqua dest (ad 20 ml)

2.5.2 Gelzusammensetzung

1. Trenngel:	Stammlösung A 3 ml / Stammlösung C 6 ml Aqua dest 3 ml / Stammlösung G 12 ml (Diaethylaminoproprionitril (DMAPN) 0,2 ml) - mischen und gleich einfüllen.
2. Rinse:	Stammlösung B 2 ml / Stammlösung E 2 ml Aqua dest 12 ml
3. Sammelgel:	Stammlösung B 2 ml / Stammlösung D 4 ml / Stammlösung E 2 ml / Stammlösung F 8 ml - mischen und polymerisieren.
Probelösung für Mikro-Disc:	Stammlösung F 7 ml / Stammlösung B 1 ml

2.5.3 Lösungen für die Laurell-Elektrophorese

1. Veronal-/HCl-Puffer 0,6 M; 12,36 g Barbital-Na/l H_2O
   Fa. Merck Chemis; Barbital-Na in etwas H_2O lösen, mit 1 M HCl auf pH 8,6 einstellen und mit H_2O auf 1 Liter auffüllen.

2. Veronal-/HCl-Puffer 0,015 M
   (Veronal-/HCl-Puffer 0,6 M 1:4 verdünnt; 25 Teile Veronal/HCl und 75 Teile H_2O)

3. 0,8 %ige Agarose in 0,015 M Veronal (Aldrich Chemicals G., Inc. Milwaukee, Wisc.)
   (0,8 g Agarose und 99 ml 0,015 M Veronal/HCl kochend lösen)

4. Antiserum-Agarose: z. B.

   a) Polivalentes Anti-Human-Serum 2 % (0,2 ml Anti-Human-Serum + 9,8 ml 0,8 %ige Agarose)

   b) Polivalentes Anti-Human-Serum von Kaninchen 4 %, (Behring Werke, Marburg, Deutschland)
   0,4 ml Anti-Human-Serum + 9,6 ml 0,8 %ige Agarose

Man braucht 7 ml Anti-Serum-Agarose für eine Laurell-Kammer.

3. Ergebnisse

3.1 Aufstellung von Eichkurven

Da das Standard-Serum der Firma Behring kein α_1-Antitrypsin enthält, mußte die Eichkurve mit einem Standard-Serum der Firma Hyland aufgestellt werden. Dabei wurden von zwei verschiedenen Serum-Verdünnungen je neun bzw. sieben Elektrophoresen durchgeführt.

In jedem Präparat wurde im vergrößerten Papierabzug die Fläche der einzelnen Peaks je fünfmal planimetriert (Abb. 2). Aus Tabelle 1 sind die Mittelwerte aus den fünf Messungen für jedes Bild bei den einzelnen Serumproteinen für beide Konzentrationen ersichtlich. (Die Ergebnisse über die neun bzw. sieben Proben sind als Mittelwert (MW) mit Standardabweichung (SD) und Standardfehler (SE) angegeben.) Aus allen Einzelwerten der Flächeneinheiten von 80- und 160-fachen Verdünnungen von Albumin, α_1-Antitrypsin und Transferrin im Hyland-Serum (s. Tab. 1), sowie den mit Hilfe der bekannten Konzentrationen obiger Serumproteine im Behring-Serum rechnerisch bestimmten Proteinmengen im Hyland-Serum, wurde die lineare Regression für die Eichkurven in Abb. 3 a-c errechnet (s. Tabl. 1). Dabei ergab sich eine gute lineare Korrelation von $R = 0{,}96$, was bei der entsprechenden Wertmenge ($N = 16$, $N = 14$) eine sehr hohe Sicherheit für die errechnete Kurve bedeutet ($p < 0{,}001$).

Da bei Hyland für die einzelnen Serumproteine die Mengen nicht bekannt sind, wurden mit einem Standard-Serum

von Behring, für welches die Proteinmengen der Serumproteine angegeben sind, die Albumin- und Transferrin-Werte des Hyland-Serums bestimmt.

Die Ergebnisse sind mit den entsprechenden Regressionsgeraden in Tabelle 2 zusammengestellt. Die α_1-Antitrypsin-Menge wurde mit Hilfe einer radialen Immundiffusion bestimmt. Die Eichkurven, die sich aus diesen Bestimmungen ergeben, sind in Abbildung 3 (a-c) wiedergegeben.

Die Serumverdünnungen für die Eichkurve wurden wie folgt zusammengestellt:

1.)	unverd. Serum					
2.)	0,2 ml	1	+	0,2 ml Probenlösung	1/2	
3.)	-					
4.)	0,1 ml	2	+	0,9 ml Probenlösung	1/20	
5.)	-					
6.)	0,5 ml	4	+	0,5 ml Probenlösung	1/40	
7.)	0,3 ml	6	+	0,3 ml Probenlösung	1/80	≙ 100 %
8.)	0,3 ml	6	+	0,3 ml 7	1/60	
9.)	0,1 ml	7	+	0,1 ml Probenlösung	1/160	≙ 50 %

Es wurden bei der Eichung 50 % ≙ 1 l von Lösung 9
100 % ≙ 2,0 l von Lösung 9

in der Disc-Laurell-Elektrophorese in 2 %iger Antihuman-Serum-Agarose verwandt.

I. Bestimmung des Albumingehalts im Hyland-Serum mit Hilfe des bekannten Gehalts im Behring-Serum

Albumingehalt im Behring-Serum		5700	mg%
Behring-Serum	50 % (160-fach verdünnt)	≙ 35,625	mg%
Behring-Serum	(80-fach verdünnt)	≙ 71,25	mg%

für Hyland-Serum gilt dann:

$$\frac{71,25}{242,75} = \frac{x}{177,48}$$

$$x = 52,29 \text{ mg\%} \triangleq 522,9 \ \mu\text{g/ml}$$

II. Bestimmung des Transferringehalts im Hyland-Serum mit Hilfe des bekannten Gehalts im Behring-Serum

Transferringehalt im Behring-Serum		380	mg%
Behring-Serum	50 % (160-fach verdünnt)	≙ 2,375	mg%
Behring-Serum	100 % (80-fach verdünnt)	≙ 4,750	mg%

für 100 %-iges Hyland-Serum gilt dann:

$$\frac{4,750}{141,4} = \frac{x}{124,96}$$

$$x = 4,20 \text{ mg\%} \triangleq 42,0 \ \mu\text{g/ml}$$

III. Bestimmung des α_1 -Antitrypsingehaltes im Hyland-Serum erfolgte durch Immunodiffusionsplatten (siehe bei 2.6)

Hyland-Serum	50 %	≙ 1,381 mg%	α_1 -Antitrypsin
Hyland-Serum	100 %	≙ 2,763 mg%	α_1 -Antitrypsin

3.2 Qualitative Bestimmung der Serumproteine im Parotissekret

Bei der Auswertung der einzelnen Sekretproben mit Hilfe der Mikro-Disc-Laurell-Elektrophorese ließen sich im Optimalfall fünf bis sechs Peaks darstellen (Abb. 4). Durch Anwendung monovalenter Antiseren wurden Albumin, α_1 -Antitrypsin, Transferrin und α_2 -Makroglobulin eindeutig identifiziert.
Es treten also nicht alle Proteine des Serums im Parotissekret auf. Daneben erkennt man, daß die quantitative Verteilung der vorhandenen Serumproteine im Parotissekret nicht der Verteilung im Serum entspricht (Vgl. Abb. 2). Albumin, α_1 -Antitrypsin und α_2 -Makroglobulin ließen sich in allen 20 Proben nachweisen. Die Serumproteine traten jedoch in den je Probe durchgeführten vier Trennungen in abnehmender Häufigkeit von Albumin, α_2 -Makroglobulin nach α_1 -Antitrypsin und Transferrin auf. Mit Ausnahme dreier Proben konnte Transferrin stets qualitativ nachgewiesen werden.

3.3 Quantitative Bestimmung der Serumproteine im Parotissekret

Von den qualitativ nachgewiesenen Proteinen wurden Albumin, α_1 -Antitrypsin und Transferrin quantitativ bestimmt. Dabei wurden von jeder Probe vier Trennungen durchgeführt. Jeder Peak wurde in der photographischen Abbildung fünfmal planimetriert. Der Mittelwert über diese fünf Messungen ist für jedes Bild in den Tabellen 3-5

aufgeführt. Außerdem sind die Mittelwerte jeder Sekretprobe und die entsprechenden Standardabweichungen absolut und in Prozent angegeben. Da es nicht möglich ist, die Antiserumkonzentration in der Agarose absolut konstant zu halten, wurde bei jedem Ansatz (18 Elektropherogramme) eine Trennung von Standard-Humanserum durchgeführt. Anhand der sich dabei ergebenden Werte kann ein Korrekturfaktor errechnet werden, der in den Tabellen 3-5 in der vorletzten Spalte angegeben ist. Die Mittelwerte für die einzelnen Sekretproben sind mit diesem Faktor korrigiert worden. Die korrigierten Werte finden sich in der letzten Spalte. Infolge eines in vier Trennungen nur einmal deutlich auftretenden Präzipitationspeaks war bei α_1 -Antitrypsin in drei Proben eine exakte quantitative Bestimmung nicht möglich. In sieben Fällen konnte Transferrin wegen eines nur angedeuteten Präzipitationspeaks überhaupt nicht und in einem Fall nur ungenau (1 Präzipitationspeak bei 4 Trennungen) quantitativ bestimmt werden. Diese Tatsachen werden in der Verkürzung der Tabellen 3-5 und 6-8 deutlich.

Die so ermittelten Flächeneinheiten wurden anhand der Eichkurve in Mikrogramm Protein pro Milliliter umgerechnet. Da die Sekretproben alle konzentriert worden waren, muß anhand der bekannten Konzentration auf die Proteinmenge in µg/ml Speichel (Parotissekret) umgerechnet werden. Diese Angaben sind in den Tabellen 6-8 zusammengefaßt. Eine Bestimmung der Serumproteine ist bis 10^{-5} g/ml Speichel möglich.

Da die Fließraten des Parotissekrets bei der Entnahme protokolliert worden waren, läßt sich auch die Protein-

menge, die pro Minute von der Parotis sezerniert wurde, bestimmen. Die Tabellen 6-8 enthalten zusätzlich für die einzelnen Serumproteine die Mittelwerte über alle Proben und die Standardabweichung (SD), sowie den Standardfehler (SE). Es zeigt sich, daß die Standardabweichung zwischen 20 % und 26 % liegt. Diese Abweichungen sind für biologisches Material normal. Bei Auswertung von organischen Substanzen bei verschiedenen Individuen muß mit einer relativen Standardabweichung von etwa 30 % gerechnet werden.
Für einige Speichelproben sind die Proteinmengen für die einzelnen Serumproteine in Abb. 5 graphisch dargestellt. Daraus wird ersichtlich, daß die Serumproteine sich von Proband zu Proband nicht gleichsinnig verändern. So ist z.B. der Transferrinwert normalerweise höher als der α_1 -Antitrypsinwert. (siehe Abb. 5 a-g) Bei einer Probe sind beide Werte gleich (siehe Abb. 5 h) oder das Transferrin liegt niedriger als das α_1 -Antitrypsin (siehe Abb. 5 i, k). Die Mengen der einzelnen Serumproteine im Parotissekret schwanken also nicht nur von Proband zu Proband, sondern auch die Relationen zueinander verändern sich.
Die Abb. 6 zeigt alle Kurven aus Abb. 5 zusammen mit einer Kurve durch die Mittelwerte, die in Tabelle 9 zusammengefaßt sind.

3.4 Abhängigkeit der Proteinkonzentration von der Fließrate

Um feststellen zu können, ob die Proteinmengen von der Fließrate abhängig sind, wurden zunächst alle gefundenen

Werte für jedes Serumprotein in Abhängigkeit von der Fließrate aufgetragen (Abb. 7). Schon die Betrachtung der Abbildung macht deutlich, daß die Serumproteinkonzentration trotz großer Schwankungen unabhängig von der Fließrate konstant bleibt. Aus diesen Werten wurde jeweils die lineare Regression errechnet, deren Steigung nicht wesentlich von Null abweicht, was die obige Aussage bestätigt.

4. Diskussion

Wie schon einleitend angedeutet, wurden über die Speicheldrüsen und ihre Sekrete bereits zahlreiche Untersuchungen angestellt, was im mittlerweile sehr umfangreichen Schrifttum zum Ausdruck kommt. Grob in Disziplinen unterteilt, bemühen sich Histologie, Biochemie, Physiologie und in jüngerer Vergangenheit die Pathophysiologie (ERICSON und JAKOBSON 1968; CHISHOLM et al. 1973; FINESTONE 1973; EICHNER, BRETZEL und HOCHSTRASSER 1976) um wissenschaftliche Klärung der anstehenden Fragen. Mehrere Autoren haben sich schon mit der Proteinanalyse von Speichel, als Misch- und Drüsenspeichel, unter qualitativen und quantitativen Gesichtspunkten beschäftigt.

Bei der Gewinnung des zu analysierenden Sekretes wurde die Beeinflussung der Fließrate durch äußere Faktoren (z.B. Geschlecht, Alter, Tageszeit) und die Fließratenabhängigkeit der Sekretzusammensetzung (Ruhespeichel, Stimulation) insoweit berücksichtigt, um mit dem Gros der Autoren übereinzustimmen, d.h. also weitgehend standardisierte und vergleichbare Bedingungen zu haben.

Mit der gemessenen durchschnittlichen Fließrate von 0,68 ml/Min. besteht weitgehende Übereinstimmung in der Sialometrie mit BENEDEK-SPAET (1973 a und b) (0,571 ml/Min.) und WINDELER/SHANNON (1967) (0,78 ml/Min.). DAWES (1967) bemühte sich, bei Stimulationsversuchen konstante Fließraten um 0,25, 0,5 und 1,0 ml/Min. zu haben. Da nur über 5-10 Minuten stimuliert wurde, kann der von DAWES festgestellte Langzeiteffekt des konstinuierlichen Ansteigens der Proteinkonzentration mit zunehmender Zeit vernachläßigt werden.

Das am weitesten verbreitete, nicht medikamentöse Stimulans ist Zitronensäure in Form von Saft oder Bonbons (BENEDEK-SPAET 1973; CALDWELL/PIGMAN et al. 1966). Ein Temperatureffekt (LOURIDIS et al. 1970) auf die Fließrate ist bei Stimulation im Gegensatz zu Ruhespeichel nicht gegeben, kann also vernachläßigt werden, zumal der Parotisspeichel auch unter gleichen räumlichen und zeitlichen Verhältnissen gewonnen wurde. Die allgemein großen Schwankungen in der Fließrate kommen wohl durch die Größe der Drüse (sekretorische Kapazität), sowie durch die individuellen Unterschiede in der gustatorischen Bewertung des jeweiligen Stimulans zustande (ERICSON 1971; SPEIRS 1971). Die Zusammensetzung des Parotissekretes ist jedoch unabhängig von der Art des Stimulans (CALDWELL/PIGMAN 1966); die Fließratenabhängigkeit vom Stimulans jedoch deutlich signifikant. Variationen der Sekretrate und -zusammensetzung im Tagesprofil sind auf jedes Individuum positiv gegeben, sie werden aber für eine quantitative Angabe in den Auswirkungen völlig durch die interindividuellen Unterschiede übertroffen (D'SILVA et al. 1962).

Geschlechtsbedingte Unterschiede im Gesamtproteingehalt bestehen nicht. (VOGT und SEMMANN 1970) - MEYER, VOGT, KLEBER (1972) haben solche nur bei einer Fraktion feststellen können. Die Probandenauswahl konnte so auf männliche Spender beschränkt werden.

Alterseinflüsse mit abnehmender Syntheseleistung der Drüse, unter anderem abnehmender Proteingehalt (VOGT/SEMANN 1970 - MEYER, VOGT, KLEBER 1973) brauchen wegen des einheitlichen jugendlichen Alters der Versuchspersonen ebenfalls nicht berücksichtigt zu werden. Physio-

logische Zusammenhänge in Abhängigkeit vom Wochentag können ebenfalls vernachläßigt werden (DAWES et al. 1972).

Ein zweifellos wichtiger unbedingt zu berücksichtigender Faktor ist die Wahrung einer 1- bis 2-stündigen Pause nach vorausgegangener Stimulation (z.B. nach Nahrungsaufnahme), um die Auswirkungen auf die Zusammensetzung des stimulierten Sekretes zu vermeiden (DAWES et al. 1972). Um intraindividuellen Schwankungen im Tagesverlauf Rechnung zu tragen (VOGT/SEMMANN 1970), wurde der Entnahmezeitraum ebenfalls normiert.

Eine Fließratenabhängigkeit des Proteingehalts im Misch- und spezifischen Drüsenspeichel wurde von allen Autoren bejaht: Vergleiche stimuliertes - unstimuliertes Sekret bei BENEDEK-SPAET (1973); Langzeitstimulationsversuch bei DAWES (1969) - WINDELER/SHANNON (1967). Eine Abhängigkeit des Serumproteingehalts von der Fließrate je Probe kann jedoch in dieser Arbeit infolge des kurzen Stimulationszeitraumes nicht als signifikant gelten.

Größere verfahrenstechnische Variationen bestehen in der Vorbehandlung des gewonnenen Sekretes. Zentrifugation mit anschließender Dialyse und Lyophilisierung sind die gebräuchlichsten Methoden zur Einengung der Probe. Die Ultrafiltration kommt jedoch in jüngerer Vergangenheit vermehrt zur Anwendung (ZIPPEL et al. 1969; MEYER/SCHNEIDER 1975; BEELEY 1969). Wie aus dem methodischen Teil ersichtlich, wurden die Speichelproben in diesem Versuchsablauf durch einen Minicon ^{TM}-Concentrator gleichzeitig einer Dialyse und Konzentration unterzogen.

Der in dieser Arbeit etwas historisch gestaltete Einführungsteil über die elektrophoretische Auftrennung des Speichels zeigt - vor allem methodisch bedingt - eine sehr große Variationsbreite der Ergebnisse (GELLER et al. 1959; HARNDT 1960; WEINSTEIN et al. 1960; SOLENOVA 1966; ZIPPEL et al. 1969; APOSTOPOULOS 1967; D'SILVA/FERGUSON 1962; MARTINA 1968; BERNARDINI et al. 1971 a und b; PINI PRATO et al. 1969 a und b - 1970; CALDWELL/PIGMAN 1965). Durch die Vorteile des Polyacrylamidgels wurden die Ergebnisse reproduzierbar (SMITH, RUNCHEY und SHAPIRO 1974), ebenso näherten sich die Zahlen der isolierten Banden einander an. Unbefriedigend ist jedoch noch die Anzahl der eindeutig identifizierten Proteinbanden bzw. Peaks, sowie die quantitative Aussage in absoluten Beträgen und Konzentrationsangaben. In dieser Arbeit sollte eine möglichst exakte qualitative und quantitative Bestimmung der Serumproteine des Parotisspeichels von gesunden Individuen erfolgen.

Quantitative Bestimmungen des Gesamtproteins im Speichel wurden schon seit längerer Zeit vorgenommen (WOLF, TAYLER 1964; DAWES 1965; MEYER, VOGT, ZIPPEL 1967 und ARNEBERG 1971). Diese meist auf Kolorimetrie beruhenden Methoden: Mikro-Kjeldahl, Biuret, Lowry, Greenberg, Waddel, Führ und Hinz, sind teilweise großen Schwankungen unterworfen, abgesehen davon, daß lediglich eine Gesamtbestimmung des Proteins möglich ist.

Quantitative Aussagen über Einzelproteine erfolgten bisher nur durch relativen Größenvergleich der Bandenbreite (CALDWELL und PIGMAN 1965) oder Peakgröße (MÜNZEL und EICHNER 1974; EICHNER, MÜNZEL, BRETZEL 1975) nach erfolgter Trennung. So konnten z.B. durch direkte Densitometrie

die bei der Stimulation entstehenden Veränderungen der Proteinzusammensetzung dargestellt werden.

Zur sicheren qualitativen und genauen quantitativen Bestimmung von Proteinen in diesem Fall von Serumproteinen, ist die zweidimensionale Immunelektrophorese das Mittel der Wahl. Dieses Verfahren wurde bereits als Disc-Laurell-Elektrophoresis von GIEBEL/SAECHTLING (1973) mit Erfolg bei Humanserum, Meerschweinchen-Serum und Serumproteinen menschlicher Perilymphe durchgeführt. (Unter Disc-Laurell-Elektrophorese ist die Kombination der Mikro-Disc-Elektrophorese mit einer Mikro-Antigen-Antikörper-Überwanderungs-Elektrophorese zu verstehen.)

Eine zweidimensionale Immunelektrophorese wurde von EICHNER und Mitarbeitern (1975) zum ersten Mal auf Parotisspeichel angewandt. Diese Autoren betonen die im Vergleich zur eindimensionalen Immunelektrophorese wesentlich bessere Auftrennung der einzelnen Proteinfraktionen. "Hiermit ist insbesondere eine genauere Aussage über die Quantität der einzelnen Proteinkomponenten möglich, da die Flächeninhalte der Präzipitationspeaks ein Maß für die vorhandene Antigen-Menge sind." Es konnten mit Antihuman-Serum 5 Peaks präzipitiert werden, wovon 3 als Immunglobulin A, Immunglobulin G und Albumin identifiziert werden konnten. Eine absolute quantitative Aussage erfolgt nicht.

Hinsichtlich des Elutionsprofils der 2. Dimension dieser Untersuchung bestehen große Ähnlichkeiten zu EICHNER und Mitarbeiter (1975). Es bestehen ebenfalls große individuelle Schwankungen bei den einzelnen Proteinanteilen. Bei jeder Probe konnten jeweils minimal 3 bis maximal 6

Peaks isoliert werden, von diesen wurden wiederum durch spezifische monovalente Antiseren als Albumin, α_1 -Antitrypsin, Transferrin und α_2 -Makroglobulin identifiziert und bis auf α_2 -Makroglobulin einer quantitativen Bestimmung durch Planimetrie unterzogen. Ein gesicherter quantitativer Nachweis ist nur für Albumin bei allen Proben möglich. Obwohl α_1 -Antitrypsin in allen Proben qualitativ nachweisbar war, konnte es in drei Fällen wegen nur angedeuteter Präzipitationspeaks nicht quantitativ bestimmt werden. Transferrin konnte in drei Fällen nicht einmal qualitativ und in sieben Fällen nicht quantitativ ausgewertet werden. Wegen der engen Randbeziehung und unscharfen Peakbasis wurde bei α_2 -Makroglobulin auf eine quantitative Auswertung verzichtet. Mit Hilfe einer Eichkurve ist ausgehend von Behring-Human-Serum eine exakte Angabe obiger 3 Serumproteine in µg/ml Speichel und µg im Speichel/Minute möglich. - Der sichere qualitative Nachweis von α_1 -Antitrypsin im Parotisspeichel mit Hilfe dieser Methode, sowie die quantitative Bestimmung in absoluten Angaben sind ein Novum; dies beweist die Tauglichkeit und vielseitige Anwendbarkeit der Disc-Laurell-Elektrophorese.

Serumproteine sind durch das bestehende käufliche Angebot fertiger Serumpräparate einer Analyse gut zugänglich. Die Untersuchungen von BENNICK et al. (1971) - LEVINE/ELLISON (1973), sowie EICHNER/HOCHSTRASSER und Mitarbeiter (1975) zeigen jedoch, daß im Speichel noch zahlreiche andere, spezifisch drüseneigene Proteine vorhanden sind, deren Präzipitation durch Kaninchenantiserum (EICHNER 1975), Ziegen- und Kaninchenantiserum (LEVINE/ELLISON 1973) gelungen ist. Hier liegt zweifellos die Zukunft einer umfassen-

den Proteinanalyse des Speichelsekrets der einzelnen Drüsen.

Ein weiteres Ziel der exakten quantitativen Bestimmung der Serumproteine sollte die genaue Kenntnis der pathologisch unbeeinflußten Zusammensetzung des Sekretes zur vergleichenden Diagnostik für entzündliche und degenerative Speicheldrüsenerkrankungen sein.

5. Zusammenfassung

1.) Von 20 gesunden Individuen wurde unter allgemein üblichen Stimulationsbedingungen unter Berücksichtigung bestimmter äußerer Faktoren reines Parotissekret gewonnen.

2.) Durch eine zweidimensionale Immun-Elektrophorese als Kombination einer Mikro-Disc-Elektrophorese mit einer Mikro-Antigen-Antikörper-Überwanderungs-Elektrophorese konnten Albumin, α_1 -Antitrypsin, Transferrin und α_2-Makroglobulin durch entsprechende Antiseren immunologisch bestimmt werden.

3.) Durch planimetrische Bestimmung der einzelnen Flächen der Präzipitationspeaks ist eine exakte quantitative Aussage über den Gehalt obiger Serumproteine in µg/ml Speichel und µg Serumprotein im Speichel/Minute möglich.

4.) Es bestehen durchschnittlich interindividuelle Unterschiede im Bereich von 20-26 %.

5.) Eine Fließratenabhängigkeit im Sinne einer Zu- oder Abnahme des Serumproteingehalts ist unter obigen Bedingungen bei zunehmender Fließrate nicht nachweisbar.

6.) Die Mikro-Disc-Laurell-Elektrophorese ist schon bei geringen Serumproteinkonzentrationen zur genauen qualitativen und quantitativen Bestimmung anwendbar.

6. Literaturverzeichnis

1. Apostopoulos, A. X. : Continous-flow paper electrophoresis in the fraktionation of human salivary secretion
Archs. oral Biol. 12/11, 1275 - 1281 (1967)

2. Arneberg, P. : Quantitative determination of protein in saliva. A comparison of analytical methods.
Scand. J. Dent. Res. 79, 60 - 64 (1971)

3. Arneberg, P. : Fraktionation of parotid salvary proteins by isoelectric focusing in a wide pH-range
Scand. J. Dent. Res. 80, 134 - 138 (1972)

4. Beeley, J. A. : Separation of human salivary proteins by isoelectric focusing in polyacrylamid gels
Archs. oral Biol. 14, 559 - 561 (1969)

5. Bellavia, S. L. : Electrophoresis of proteins from human parotid saliva
Archs. oral Biol. 16,
751 - 758 (1971)

6. Bellavia, S. L. ; Galmarini, M. ; Yantomo, C. : Localisation of immunoglobulin A in electrophoretic patterns of proteins from human parotid saliva
J. Dent. Res. 51,
1555 - 1560 (1972)

7. Benedek-Spaet, E. : The composition of unstimulated human parotid saliva
Archs. oral Biol. 18,
39 - 47 (1973 a)

8. Benedek-Spaet, E. : The composition of stimulated human parotid saliva
Archs. oral Biol. 18/9,
1091 - 1097 (1973 b)

9. Bennick, A. ; Connell, G. E. : Purification and partial charakterisation of four proteins from human parotid saliva
Biochem. J. 123,
455 - 464 (1971)

10. Bernardini, U. D. ; Panzoni, E. ; Grandini, R. : Frazionamento delle proteine della saliva umana mediante cromatografia per gel-filtrazione su sephadex G 200 Riv. Ital. Stomatol. 26, 601 - 604 (1971 a)

11. Bernardini, U. D. ; Panzoni, E. ; Grandini, R. : Frazionamento delle proteine salivari su resine a scambio ionico Riv. Ital. Stomatol. 26/6, 455 - 460 (1971 b)

12. Caldwell, R. C. ; Pigman, W. : Disc electrophoresis of human saliva in polyacrylamid gel Archs. of Biochemistry and Biophysics 110, 91 - 96 (1965)

13. Caldwell, R. C. ; Pigman, W. : Changes in protein and glycoprotein concentrations in human submaxillary saliva under various stimulatory conditions Archs. oral Biol. 11, 437 - 449 (1966)

14. Chisholm, D. M. ; Beeley, J. A. ; Mason, Ph. D. u. D. K. : Salivary proteins in Sjögren's syndrome: Separation by isoelectric focusing in acrylamide gels J. oral Surg. 620 - 630 (1973)

15. Davis, B. J. : Disc electrophoresis - II Method and application to human serum proteins Ann. New York Acad. Sci 121, 404 - 427 (1964)

16. Dawes, C. : Some charakteristics of parotid and submandibular salivary proteins Archs. oral Biol. 10, 269 - 278 (1965)

17. Dawes, C. : The effect of flow rate and length of stimulation on the protein concentration in the human parotid saliva Archs. oral Biol. 12, 783 - 788 (1967)

18. Dawes, C. : The effect of flow rate and duration of stimulation on the concentration of protein and the main electrolytes in human parotid saliva Archs. oral Biol. 14, 277 - 294 (1969)

19. Dawes, C. ; Chebib, F. S. : The influence of previous stimulation and the day of the week on the concentrations of proteins and the main electrolytes in human parotid saliva Archs. oral Biol. 17, 1289 - 1301 (1972)

20. Dawes, C. ; Ong, B. Y. : Circadian rhythms in the concentrations of protein and the main electrolytes in human unstimulated parotid saliva Archs. oral Biol. 18, 1233 - 1242 (1973)

21. Dawes, C. : Rhythms in salivary flow rate and composition International Journal of Chronobiology 2, 253 - 279 (1974)

22. D'Silva, I. L. ; Ferguson, D. B. : Zone electrophoresis of human parotid saliva in various media Archs. oral Biol. 7, 563 - 571 (1962)

23. Eichner, H.; Münzel, M. ; Bretzel, G. : Vergleichende Untersuchungen von Flußraten, Elektrolyt- und Gesamteiweißkonzentrationen und

discelektrophoretische Auftrennung des Sekretes an fraktioniert gewonnenem menschlichen Parotissekret
Laryng. Rhinol. 54,
19 - 27 (1975)

24. Eichner, H. ; Münzel, M. ; Bretzel, G. ; Hochstrasser, K. : Vergleichende Untersuchungen der Proteinfraktionen von menschlichem Parotissekret mittels ein- und zweidimensionaler Immunelektrophorese, Immunodiffusion und Discelektrophorese
Laryng. Rhinol. 54,
105 - 113 (1975)

25. Eichner, H. ; Bretzel, G. ; Hochstrasser, K. : Simultane Bestimmung von Fließrate, Gesamteiweiß, Lysozym und Immunglobulin A bei Drüsensekreten von menschlichen Ohrspeicheldrüsen mit pleomorphen Adenomen
Laryng. Rhinol. 55,
586 - 592 (1976)

26. Ericson, S. ; Jakobson, K. A. : A secretory and clinical investigation of the parotid glands in patients with rheumatoid arthritis
Acta oto-laryngologica 66,
101 - 112 (1968)

27. Ericson, S. : The variability of the human parotid flow rate on stimulation with citric acid, with special reference to taste
Archs. oral Biol. 16, 9 - 19 (1971)

28. Ferguson, D. B. ; Fort, A. ; Elliott, A. L. ; Potts, A. J. : Circadian rhythms in human parotid saliva flow rate and composition
Archs. oral Biol. 18, 1155 - 1173 (1973)

29. Finestone, A. J. ; Schacterle, G. R. ; Pollack, R. L. : The comparative analysis of diabetic and non-diabetic saliva: Protein separation by disc-gel-electrophoresis
J. Periodontol. 44, 175 - 176 (1973)

30. Fischer, C. J. ; Wyshak, G. H. ; Weisberger, D. : The separation of salivary proteins by paper electrophoresis under varions conditions
Archs. oral Biol. 7, 297 - 305 (1962)

31. Geller, J. H. ; Hames, L. ; Rovelstad, G. H. : Electrophoresis of saliva
J. Dent. Res. 38, 854 - 859 (1959)

32. Giebel, W. ; Saechtling, H. : A combination of micro-disc electrophoresis with antigen-antibody crossed electrophoresis Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 673 - 681 (1973)

33. Giebel, W. ; Wespi, H. : Serumproteine u. Aminosäuren in menschlicher Perilymphe Archiv. klin. exp. Ohren-, Nasen- u. Kehlkopfheilkunde 205, 183 - 186 (1973)

34. Harndt, R. : Die Papierelektrophorese des Parotisspeichels Dt. Zahn-, Mund- u. Kieferheilkunde 32/5, 194 - 202 (1960)

35. Hugoson, A. : Salivary secretion in pregnancy. A longitudinal study of flow rate, total protein, sodium, potassium and calcium concentration in parotid saliva from pregnant women Acta odont. scand. 30/1, 49 - 66 (1972)

36. Laurell, C. B. : Antigen-antibody crossed electrophoresis
Anal. Biochem. 10,
358 - 366 (1965)

37. Laurell, C. B. : Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose containing antibodies
Anal. Biochem. 15,
45 - 56 (1966)

38. Levine, M. J. ; Ellison, S. A. : Immuno electrophoretic and chemical analysis of human parotid saliva
Archs. oral Biol. 18/7,
839 - 853 (1973)

39. Louridis, O. ; Demetriou, N. ; Bazopoulou-Kyrkanides, E. : Chewing effects on secretion rate of stimulated human mixed saliva
J. Dent. Res. 49/5,
1132 - 1135 (1970)

40. Louridis, O. ; Demetriou, N. ; Bazopoulou-Kyrkanides, E. : Environmental temperature effect on the secretion rate of "resting" and stimulated human mixed saliva
J. Dent. Res. 49/5,
1136 - 1140 (1970)

41. Mandel, J. D. ; Ellison, S. A. : Characterisation of salivary components separated by paper electrophoresis Archs. oral Biol. 3, 77 - 85 (1961)

42. Martina, G. ; Pippione, M. ; Sartoris, S. : L'immunoelettroforesi su saliva umana normale Minerva Dermatologica 43, 534 - 535 (1968)

43. Massen, P. L. ; Carbonara, A. O. ; Heremans, J. F. : Studies on the proteins of human saliva Biochem., Biophys. Acta 107, 485 - 500 (1965)

44. Maurer, R. H. : Discelektrophorese; 1. Auflage Berlin: Walter de Gruyter, 1968

45. Meyer, P. ; Vogt, K. ; Zippel, R. : Zur Bestimmung von Gesamteiweiß im Speichel Laryng. Rhinol. 46/12, 905 - 910 (1967)

46. Meyer, P. ; Vogt, K. ; Kleber, R. R. : Zur Beeinflussung der Proteine des Parotisspeichels durch Alter und Geschlecht Dt. Zahn-, Mund- u. Kieferheilkunde 60, 392 - 399 (1973)

47. Meyer, P. ; Schneider, D. : Der Albumingehalt des Parotisspeichels unter Berücksichtigung des Lebensalters
Z. Laryng. Rhinol. 54, 551 - 553 (1975)

48. Meyer, P. ; Vogt, K. ; Kleber, R. R. : Statistische Verteilung der Eiweißfraktionen des Parotisspeichels nach Trennung mit der Celluloseacetatfolienelektrophorese (CAFE)
Z. Laryng. Rhinol. 51, 194 - 197 (1972)

49. Meyer, P. ; Kleber, R. R. : Die Normalverteilung der Parotisspeichelproteine des Menschen nach Discelektrophorese im alkalischen und sauren Gelsystem
Laryng. Rhinol. 54, 965 - 969 (1975 a)

50. Meyer, P. ; Kleber, R. R. : Zur quantitativen Verteilung der Proteinfraktionen des menschlichen Parotisspeichels vor und nach gustatorischer Stimulation im Discelektropherogramm in verschiedenen Polyacrylamidgelsystemen
Laryng. Rhinol. 54, 95 - 104 (1975 b)

51. Meyer, T. S. ; Lamberts, B. L. : Zone electrophoresis of human parotid saliva in acrylamide gel Nature (Lond.) 205, 1215 - 1216 (1965 a)

52. Meyer, T. S. ; Lamberts, B. L. : Use of coomassie brilliant blue R 250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide gel strips Biochim. Biophys. Acta 107, 144 - 145 (1965 b)

53. Meyer, T. S. ; Lamberts, B. L. : The use of wool fast blue BL for the electrophoresis of human parotid saliva proteins in acrylamide gel Archs. oral Biol. 13, 839 - 840 (1968)

54. Münzel, M. ; Eichner, H. : Diskelektrophoretische Untersuchungen zum Proteingehalt des menschlichen Parotissekretes Laryng. Rhinol. 53, 868 - 871 (1974)

55. Muus, J. ; Vnenchak, J. M. : Isomylases of saliva Nature 204, 283 - 284 (1964)

56. Ochterlony, O. : Diffusion-in-Gel-Methods for immunological analysis
Progress. Allerg. 5, 1 - 12 (1958)

57. Oppenheim F. G. ; Hay, D. J. : Further studies of human serum albumin in oral fluid
Helv. Odontol. Acta 16/1, 22 - 26 (1972)

58. Ornstein, L. ; Davis, B. J. : Discelectrophoresis
Destillation Products Industries Div.
Eastman Kodak Co.
Rochester, New York (1959)

59. Pini Prato, G. ; Huober, G. ; Bernardini, U. D. : Analisi della composizione proteica del secreto della ghinadola sottomascellare e parotidea umana
Riv. Ital. Stomat. 24, 1332 - 1336 (1969 a)

60. Pini Prato, G. ; Bernardini, U. D. ; Huober, G. : Composizione proteica della saliva umana: Analisi mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide
Riv. Ital. Stomat. 24, 1197 - 1203 (1969 b)

61. Pini Prato, G. ; Bernardini, U. D. ; Grandini, R. : Frazionamento delle proteine salivari su gel di poliacrilammide mediante elettroforesi anionica Riv. Ital. Stomat. 25, 559 - 563 (1970)

62. Rauch, S. : Die Speicheldrüsen des Menschen; 1. Auflage Stuttgart: Thieme 1959

63. Rapoport, S. M. : Medizinische Biochemie; 5. Auflage Berlin-Ost: Volk und Gesundheit 1969

64. Scheidegger, A. : Une micromethode de l'immunoelectrophorese Int. arch. Allergy 7, 103-110 (1955)

65. Schübel, F. ; Königs, H. : Beobachtungen über das Verhalten der Gesamtproteine im Parotisspeichel während der Schwangerschaft Dtsch. zahnärztl. Z. 26, 46 - 51 (1971)

66. Shannon, I. L. ; Feller, R. P. ; Suddick, R. P. : Light deprivation and parotid flow in the human J. Dent. Res. 51/6, 1642 - 1645 (1972)

67. Shannon, I. L. ; Feller, P. R. ; Suddick, R. P. : Effects of light and darkness on human parotid salivary flow rate and chemical composition
Archs. oral Biol. 18, 601 - 608 (1973)

68. Smith, Q. T. ; Runchey, C. D. ; Shapiro, B. L. : Polyacrylamide gel slab electrophoresis of human salivary proteins
Archs. oral Biol. 19, 407 - 410 (1974)

69. Speirs, R. L. : The effects of interactions between gustatory stimuli on the reflex flow rate of human parotid saliva
Archs. oral Biol. 16/4, 351 - 365 (1971)

70. Solenova, A. A. : Electrophoretic investigation of proteins contained in the parotid saliva
Stomatologiia (Moskau) 45, 16 - 18 (1966)

71. Steiner, J. C. ; Keller, P. J. : An electrophoretic analysis of the protein components of human parotid saliva
Archs. oral Biol. 13, 1213 - 1222 (1968)

72. Waldeyer, A. : Anatomie des Menschen; 6. Auflage Berlin 1970: Walter de Gruyter u. Co.

73. Vogt, K. ; Semmann, W. M. : Zur physiologischen Beeinflussung der Gesamtproteinsekretion der großen Kopfspeicheldrüsen durch Tageszeit, Alter und Geschlecht Z. Laryng. Rhinol. 49/9, 611 - 620 (1970)

74. Weinstein, E. ; Heskins, D. ; Jackson, S. W. : An improved technique for the paperelectrophoresis of parotid saliva J. Dent. Res. 39, 110 - 115 (1960)

75. Windeler, A. S. Jr. ; Shannon, J. L. : The effect of flow rate on parotid fluid calcium and protein levels Archs. oral Biol. 11, 1043 - 1045 (1966)

76. Windeler, A. S. ; Shannon, J. L. : Effect of flow rate on parotid fluid calcium, magnesium and protein concentrations in man Archs. oral Biol. 12, 1063 - 1069 (1967)

77. Wolf, R. O. ; Taylor, L. L. : A comparative study of saliva protein analysis Archs. oral Biol. 9, 135 - 140 (1964)

78. Zippel, R. ; Meyer, P. ; Schubel, F. ; Bietz, G. : Zur Elektrophorese des Parotissekretes Z. Laryng. Rhinol. 48/7, 500 - 504 (1969)

Abb. 1

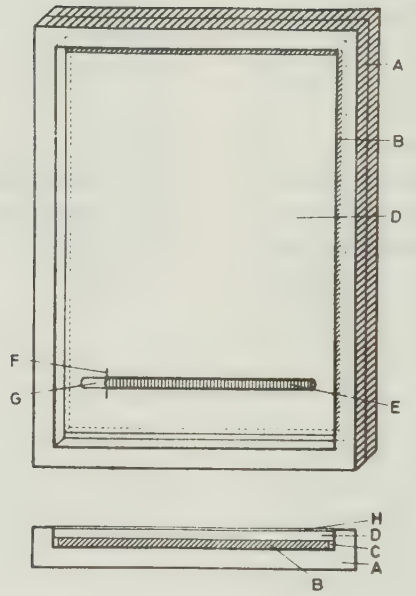
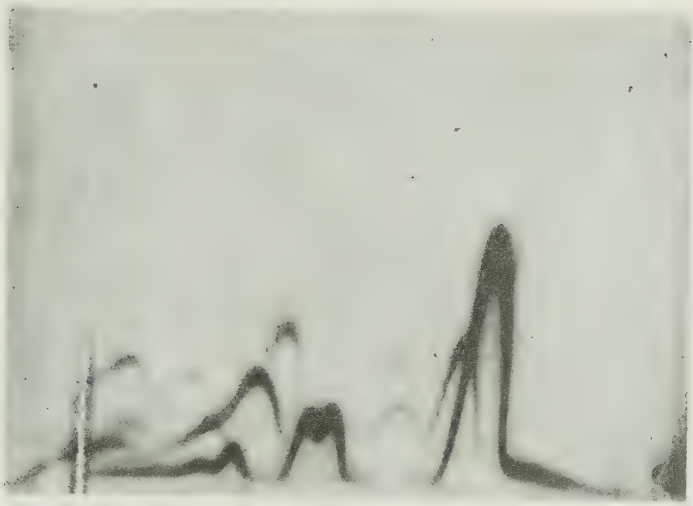


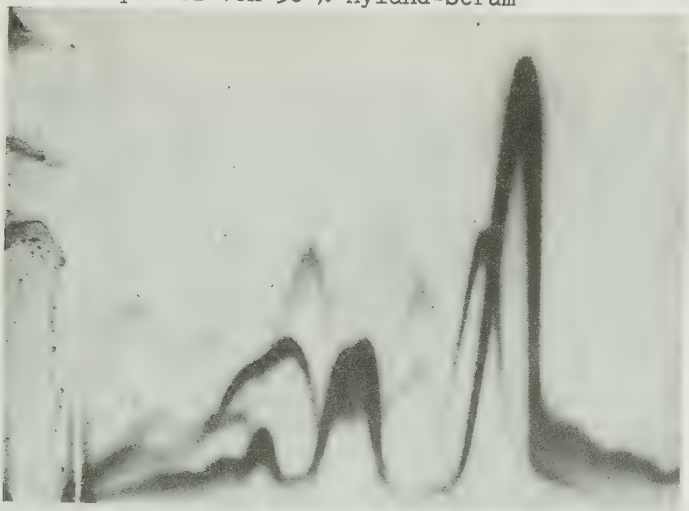
Abb. 1: Anordnung einer horizontalen Mikro-Antigen-Antikörper-Überwanderungs-Elektrophorese in antiserumhaltigem Agarosegel.

A: Plastikrahmen
B: Objektträger
C: 0,8 % Agarosegel
D: 0,8 % Agarosegel mit Antiserum
E: Trenngel
F: Sammelgel
G: Startmarkierung der Mikro-Disc-Trennung auf dem Objektträger
H: Parafilm

Abb. 2 a, b



a) Elutionsprofil von 50 % Hyland-Serum



b) Elutionsprofil von 100 % Hyland-Serum

Abb. 3 a, b, c

Abb 3a

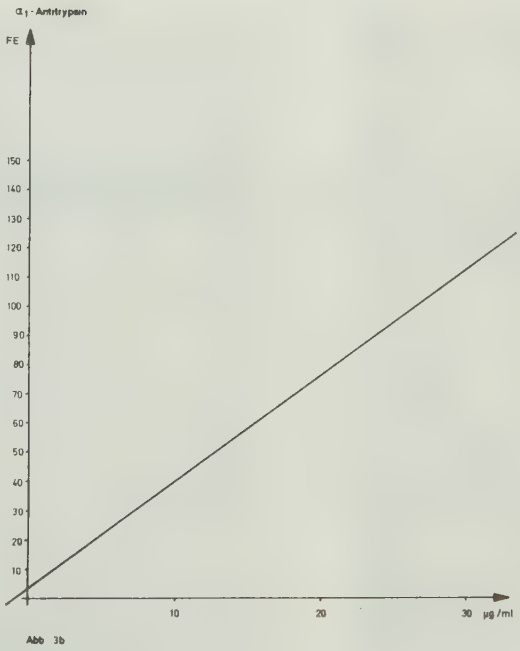


Abb 3b

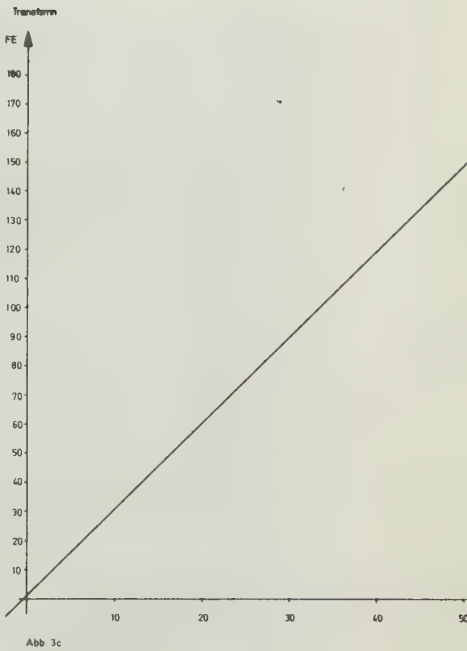
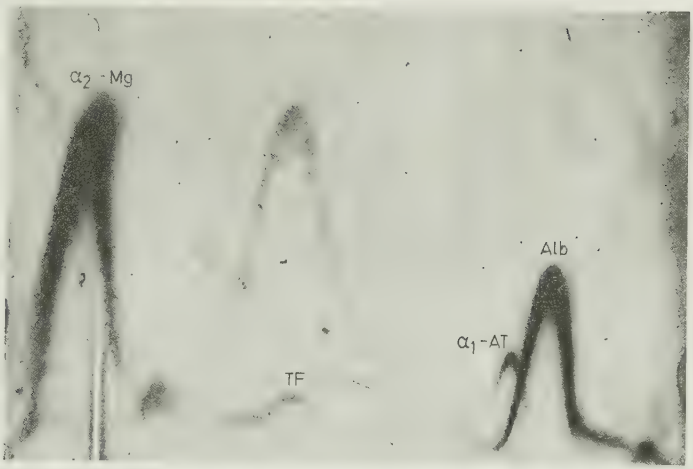


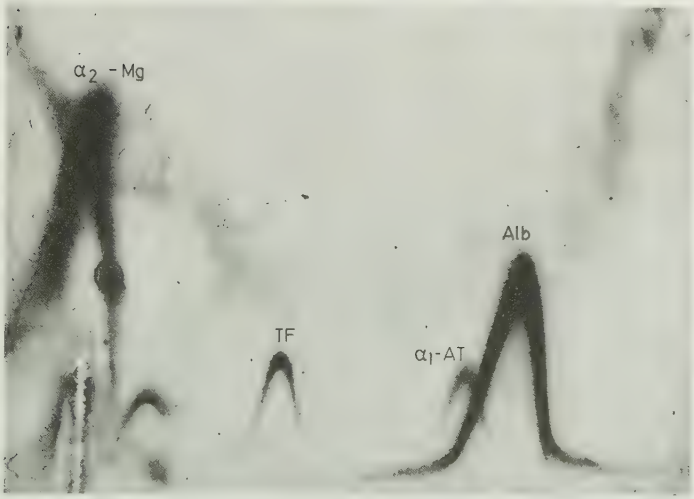
Abb 3c

Eichkurven zur quantitativen Bestimmung von Albumin, α_1 -Antitrypsin und Transferrin

Abb. 4 a, b



a) Elutionsprofil von Speichelprobe Nr. 2 von links nach rechts: α_2 -Makroglobulin, Transferrin, α_1 -Antitrypsin und Albumin.
Der große Peak in der Mitte des Bildes wurde nicht identifiziert.



b) Elutionsprofil von Speichelprobe Nr. 6

Abb. 5 a - d

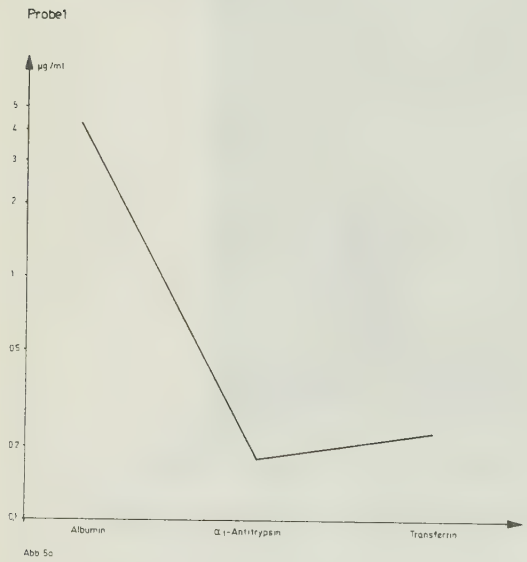


Abb 5a

a)

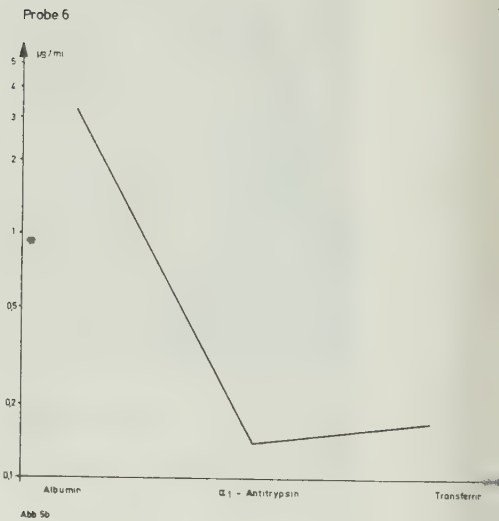


Abb 5b

b)

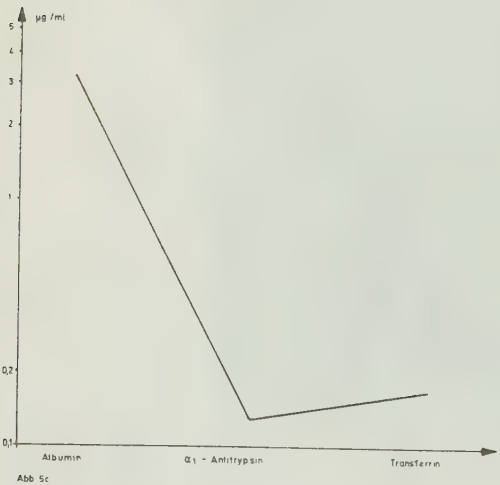


Abb 5c

c)

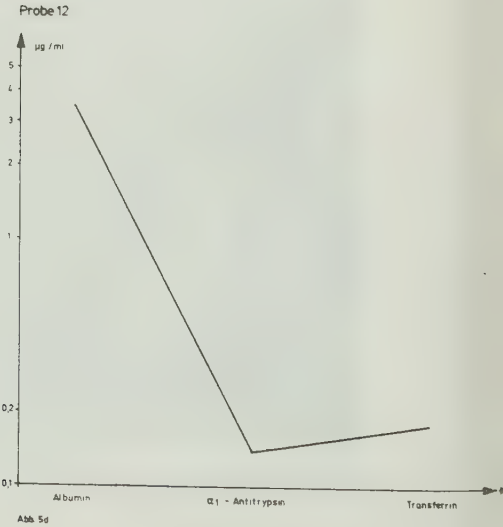


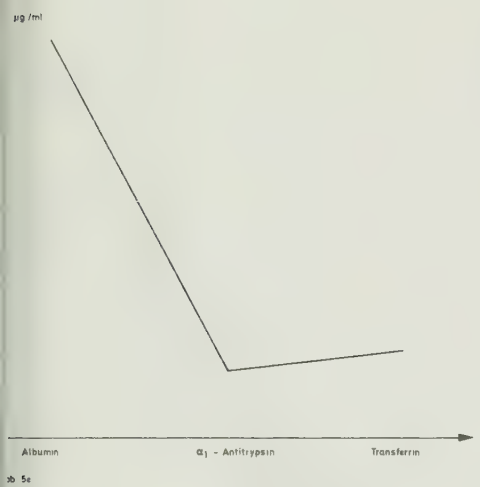
Abb 5d

d)

Abb. 5 e - h

obe 15

µg /ml



bb 5e

e)

Probe 9

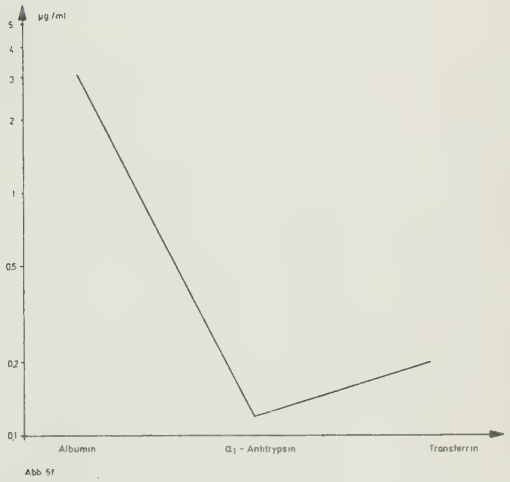


Abb 5f

f)

robe 17

µg /ml

bb 5g

g)

Probe 14

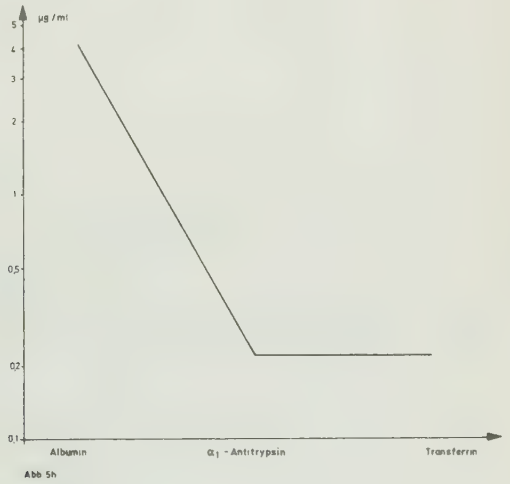
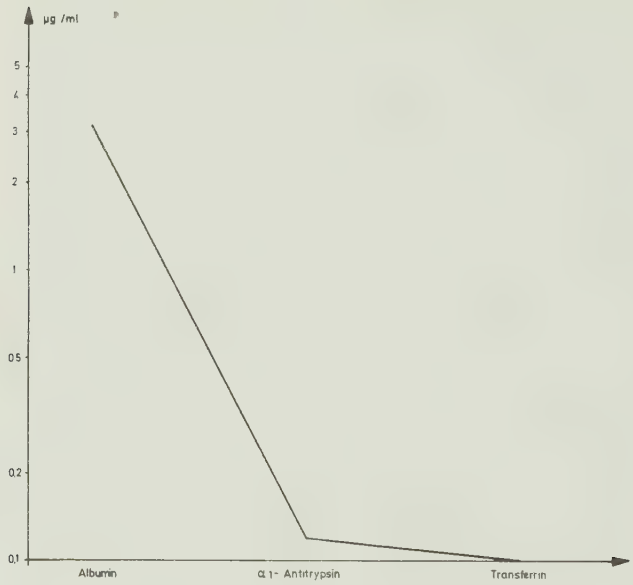


Abb 5h

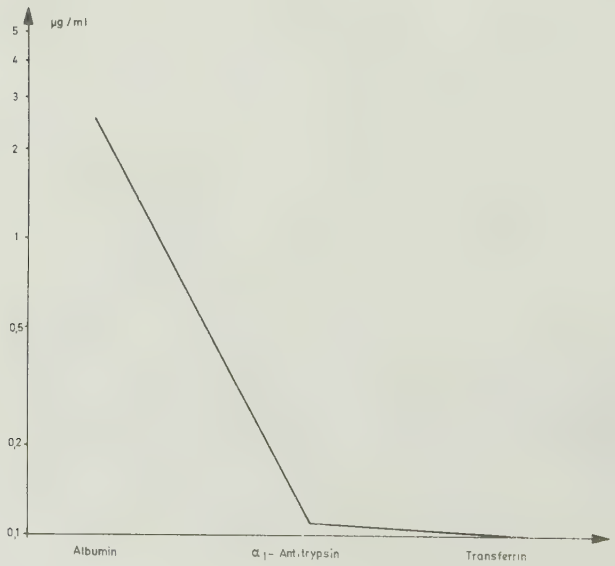
h)

Probe 3



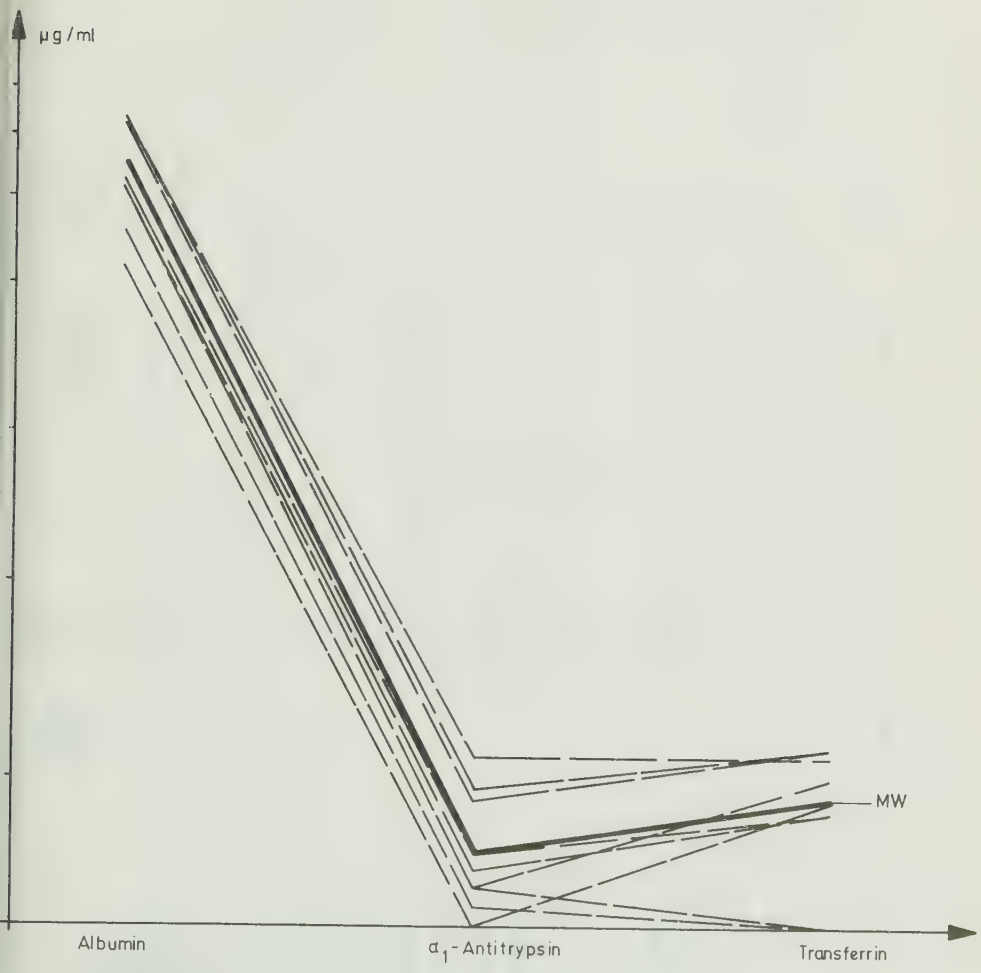
i) Abb. 5i

Probe 16



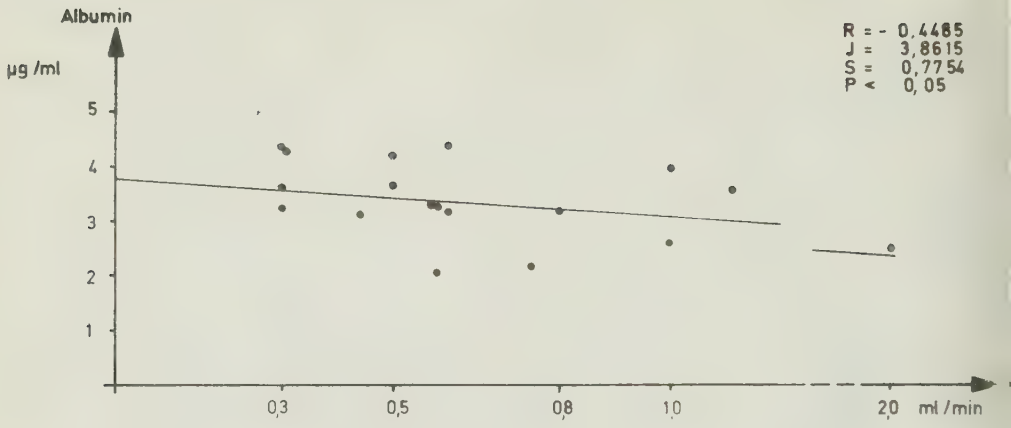
k) Abb 5k

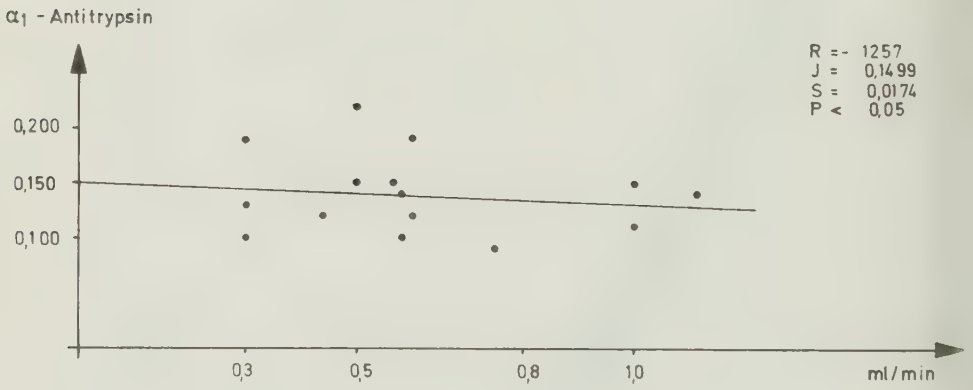
Abb. 6



MW = Mittelwert

Abb. 6


Albumin
µg/ml
R = - 0,4485
J = 3,8615
S = 0,7754
P < 0,05
5
4
3
2
1
0,3
0,5
0,8
1,0
2,0
ml/min


α1 - Antitrypsin
R = - 1257
J = 0,1499
S = 0,0174
P < 0,05
0,200
0,150
0,100
0,3
0,5
0,8
1,0
ml/min

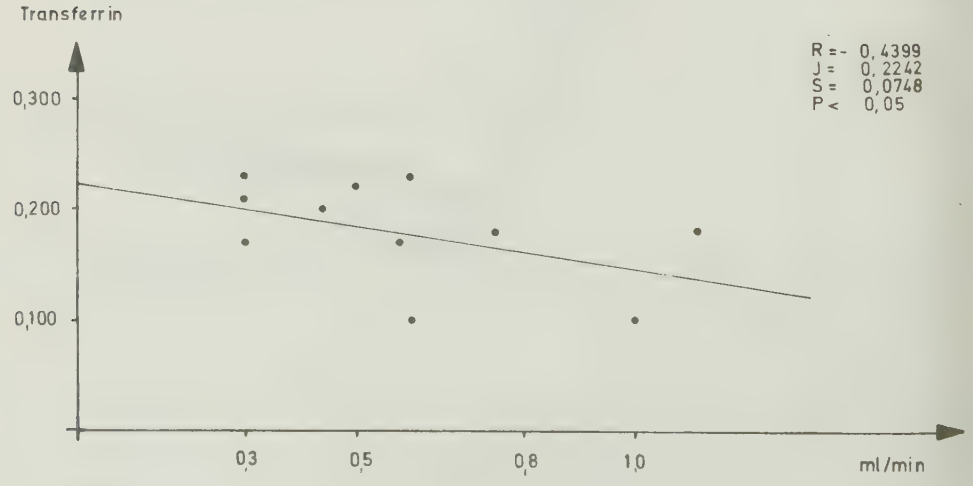

Transferrin
R = - 0,4399
J = 0,2242
S = 0,0748
P < 0,05
0,300
0,200
0,100
0,3
0,5
0,8
1,0
ml/min

Abb. 7

Tabelle 1

ALBUMIN

Flächeneinheiten FE	Hyland-Serum 1:160 verdünnt								
MW 5 Messungen	82,8	86,2	81,2	84,8	87,4	76,8	83,2	106,2	103,6

Flächeneinheiten FE	Hyland-Serum 1:80 verdünnt						
MW 5 Messungen	154,8	178,8	166,0	174,6	199,6	184,8	198,6

Gesamtmittelwert *: 177,48 ± 18,05 (SD % 10,17) (SE % 2,54)

Regressionsgerade

R: 0,9652 N = 16
I: -3,5556 v = 14
S: 0,35034 P < 0,001

-ANTITRYPSIN

Flächeneinheiten FE	Hyland-Serum 1:160 verdünnt						
MW 5 Messungen	49,2	50,8	54,0	54,6	57,4	52,0	51,6

Flächeneinheiten FE	Hyland-Serum 1:80 verdünnt						
MW 5 Messungen	87,2	96,4	102,8	106,0	111,8	91,6	110,4

Gesamtmittelwert *: 103,24 ± 7,79 (SD % 7,55) (SE % 2,02)

R: 0,9661 N = 14
I: 3,7916 v = 12
S: 3,54876 P < 0,001

TRANSFERRIN

Flächeneinheiten FE	Hyland-Serum 1:160 verdünnt						
MW 5 Messungen	57,2	65,2	61,6	67,6	62,8	60,8	64,6

Flächeneinheiten FE	Hyland-Serum 1:80 verdünnt						
MW 5 Messungen	124,2	154,5	126,0	128,6	106,2	122,2	108,2

Gesamtmittelwert *: 124,96 ± 11,77 (SD % 9,42) (SE % 2,52)

R: 0,9448 N = 14
I: 1,4292 v = 12
S: 2,92378 P < 0,001

Tabelle 2

ALBUMIN

Flächeneinheiten FE	Behring-Serum 1:600 verdünnt					
MW 5 Messungen	108,2	109,2	132,8	144,8	115,2	115,2

Flächeneinheiten FE	Behring-Serum 1:300 verdünnt				
MW 5 Messungen	238,2	227,2	237,0	242,8	266,8

Gesamtmittelwert *: 242,07 ± 22,76 (SD % 9,40) (SE % 2,83)

Regressionsgerade
R: 0,9766 N = 11
I: -0,599$\overline{9}$ v = 9
S: 0,34105 P < 0,001

TRANSFERRIN

Flächeneinheiten FE	Behring-Serum 1:600 verdünnt				
MW 5 Messungen	63,2	77,8	70,6	78,8	65,4

Flächeneinheiten FE	Behring-Serum 1:300 verdünnt				
MW 5 Messungen	153,0	145,6	140,0	140,6	123,2

Gesamtmittelwert *: 141,4 ± 11,96 (SD % 8,46) (SE % 2,68)

R: 0,9728 N = 10
I: 1,8400 v = 8
S: 2,91874 P < 0,001

* Durch Multiplikation der Mittelwerte von Flächeneinheiten (FE) der Präzipitationspeaks von Albumin, α_1-Antitrypsin und Transferrin des Hyland-Serums (1:160), sowie Albumin und Transferrin des Behring-Serums (1:600) mal dem Faktor 2 konnten die angegebenen Gesamtmittelwerte errechnet werden. Dies entspricht einer 80-fachen bzw. 300-fachen Verdünnung.

Tabelle 3

ALBUMIN I

Ermittlung der Flächeneinheiten der Peaks pro Probe

Pr	Bd		Bd		Bd		Bd		MW SD	MW	bei Entfallen v. Bd	Korr.Fkt.	FE
1	51	64,0	53	57,2	65	54,4	67	80,0	63,9 ± 11,47	63-	58,53±4,94 (8,43 %)	0,943	55,165
2	9	68,2	11	73,4	13	53,6	15	62,2	64,35 ± 8,5	13-	67,93±5,60 (8,25 %)	0,949	64,52
3	17	55,4	19	57,6	21	56,4	23	62,4	57,95 ± 3,1		57,95±3,10 (5,35 %)	0,949	55,04
4	7	60,8	9	57,8	11	51,2	13	59,2	57,40 ± 3,93	11-	59,26±1,50 (2,53 %)	0,943	55,919
6	23	58,2	25	49,8	27	55,4	29	59,6	55,75 ± 4,33	25-	57,73±2,14 (3,70 %)	0,943	54,44
7	31	71,8	33	72,6	35	83,4	37	77,6	76,35 ± 5,36		76,35±5,36 (7,01 %)	0,943	72,04
8	49	66,0	51	59,2	53	58,0	55	62,2	61,35 ± 3,75		61,35±3,75 (5,82 %)	0,943	57,85
9	11	89,4	13	59,4	15	83,2			77,33±15,84	13-	86,3 ± 4,38 (5,08 %)	0,964	83,20
10	39	41,2	41	56,4	43	61,4			53,00±10,52	39-	58,9 ± 3,54 (6,00 %)	0,949	55,94

Pr = Probe
Bd = Bild
MW = Mittelwert
SD = Standardabweichung
Korr.Fkt. = Korrekturfaktor
FE = Flächeneinheit

Tabelle 3

ALBUMIN II

Pr	Bd		Bd		Bd		Bd		MW SD	MW	bei Entfallen von Bd	Korr.Fkt.	FE
11	45	63,2	47	77,6	49	68,8	51	54,9	67,25 ± 7,91		67,25±7,91 (11,76 %)	0,949	63,87
12	23	71,6	25	70,2	27	77,4			73,07 ± 3,82		73,07±3,82 (5,22 %)	0,946	70,45
13	1	45,6	3	40,8	5	44,6			43,67 ± 2,53		43,67±2,53 (5,80 %)	1,111	48,53
14	15	71,0	17	99,8	19	76,2	21	80,2	81,80±12,58	17-	75,80±4,61 (6,09 %)	1,111	84,24
15	23	77,8	25	71,8	27	75,2	29	84,2	77,25 ± 5,24		77,25±5,24 (6,79 %)	1,111	85,85
16	31	47,4	33	39,6	35	48,2	37	58,8	48,50 ± 7,89	37-	45,06±4,75 (10,54 %)	1,111	50,08
17	47	57,2	49	51,6	51	61,8	53	58,2	57,20 ± 4,22		57,20±4,22 (7,38 %)	0,964	55,15
18	55	53,4	57	53,0	59	59,0	61	66,8	58,05 ± 6,44	61-	55,13±3,35 (6,08 %)	0,964	53,15
19	57	93,4	59	107,2	61	92,0	63	97,0	97,40 ± 6,86		97,40±6,86 (7,05 %)	0,964	93,90
20	65	67,8	67	90,4	69	63,2	71	69,8	72,08±12,05	67-	66,93±3,38 (5,06 %)	0,964	64,53

Identische Zahlen einzelner Bilder stammen von unterschiedlichen Proben einer zeitlich späteren Versuchsreihe

Tabelle 4

α_1-ANTITRYPSIN

Pr	Bd		Bd		Bd		Bd		MW SD	MW	bei Entfallen von Bd	Korr.Fkt.	FE
1	1	28,8	3	27,4	5		7	43,0	33,01 ± 8,63	7-	28,10 ± 0,99 (3,52 %)	1,0096	28,37
2	9	33,2	11	32,2	13	22,0	15	30,6	29,50 ± 5,11	13-	32,00 ± 1,31 (4,10 %)	1,0096	32,31
3	17	25,6	19	27,2	21	22,4	23	27,0	25,55 ± 2,20		25,55 ± 2,20 (8,68 %)	1,0096	25,79
6	23	29,6			27	26,0	29	30,4	28,66 ± 2,34		28,66 ± 2,34 (8,18 %)	1,0052	28,81
8	49	42,0	51	37,0	53	29,0	55	31,2	34,80 ± 5,87	49-	32,40 ± 4,13 (12,76 %)	1,0052	31,26
9	11	43,8	13	25,8					34,80±12,73		34,80±12,73 (36,57 %)	1,0824	37,67
10	39	18,8	41	26,2	43	22,4			22,47 ± 3,70	21-	20,60 ± 2,55 (12,36 %)	1,0096	20,90
11	45	32,0	47	42,6	49	32,5	51	28,0	33,78 ± 6,22	47-	30,83 ± 2,47 (8,00 %)	1,0096	31,12
12	23	24,0	25		27	37,2			30,60 ± 9,33		30,60 ± 9,33 (30,50 %)	1,0824	33,12
14	15	43,6	17	58,4	19	46,6	21	50,8	49,85 ± 6,42	17-	47,00 ± 3,62 (7,69 %)	1,099	51,65
15	23	40,0	25	19,8	27	35,6	29	41,2	34,15 ± 9,86	25-	38,93 ± 2,95 (7,57 %)	1,099	42,78
16			33	23,8								1,099	26,15
17	47	27,4	49	24,0	51	41,0	53	30,6	30,75 ± 7,35	51-	27,33 ± 3,30 (12,08 %)	1,0824	29,58
18	55	28,6										1,0824	30,96
19	57	38,4	59	53,8	61	41,4	63	45,2	44,70 ± 6,67	59-	41,67 ± 3,41 (8,18 %)	1,0824	45,10
20	65	38,6										1,0824	41,78

Tabelle 5

TRANSFERRIN

Pr	Bd		Bd		Bd		Bd		MW SD	MW	bei Entfallen von Bd	Korr.Fkt.	FE
1	1	23,2	3	33,6	5	27,6	7	31,8	29,05 ± 4,64	1-	31,00±3,08 (9,93 %)	0,9027	27,98
3	17		19	18,8	21	14,4	23	20,0	17,73 ± 2,95	21-	19,40±0,85 (4,37 %)	0,9027	17,51
6	23	24,6	25		27	28,2	29	28,2	27,00 ± 2,08		27,00±2,08 (7,70 %)	0,9941	26,84
9	11	41,4	13	33,8	15	53,6			42,93 ± 9,99		42,93±9,99 (23,27 %)	1,1081	47,57
11	45	37,0	47	38,2	49	32,2	51	31,2	34,65 ± 3,47		37,65±3,47 (10,04 %)	0,9027	31,28
12	23	30,2	25	30,8	27				30,50 ± 0,42		30,50±0,42 (1,39 %)	1,1081	33,80
14	15	63,4	17	63,4	19	39,2	21	38,6	51,20±14,20	15- 17-	38,90±0,42 (1,09 %)	1,016	39,52
15	23	47,6	25	22,4	27	34,6	29	38,8	35,85±10,48	25-	40,33±6,63 (16,45 %)	1,016	41,00
16	31		33	19,2	35		37					1,016	19,52
17	47	41,6	49	34,4	51	25,8	53	38,0	34,95 ± 6,77	51-	38,00±3,60 (9,47 %)	1,1081	42,11

Tabelle 6

ALBUMIN

Abweichung +-3 %

Pr	FE	* µg/ml Konz.Pr	Konz. der Pr	µg/ml Speichel	ml/min	µg/min Speichel
1	55.165	167.6	38.8	4.32	0.30	1.296
2	64.520	194.3	53.2	3.65	0.50	1.826
3	55.040	167.3	53.2	3.14	0.60	1.886
4	55.919	169.8	53.2	3.19	0.80	2.553
6	54.440	165.5	51.0	3.25	0.58	1.883
7	72.040	215.8	48.8	4.42	0.31	1.371
8	57.850	175.3	53.2	3.29	0.57	1.878
9	83.200	247.6	79.8	3.10	0.44	1.365
10	55.940	169.8	47.1	3.61	0.30	1.082
11	63.870	192.5	60.0	3.21	0.30	0.962
12	70.450	211.2	60.0	3.52	1.13	3.978
13	48.530	148.7	60.0	2.48	2.00	4.956
14	84.240	250.6	60.0	4.18	0.50	2.088
15	85.850	255.2	58.2	4.38	0.60	2.631
16	50.080	153.1	60.0	2.55	1.00	2.552
17	55.150	167.6	76.5	2.19	0.75	1.643
18	53.150	161.9	79.8	2.03	0.58	1.176
19	93.900	278.2	79.8	3.49	1.00	3.486
20	64.530	194.3	59.1	3.29		

Mikrogr/ml im Speichel:

N = 19.000
Mittelwert: 3.331
S.D.: 0.695 (20.868 %)
S.E.: 0.159 (4.787 %)

Mikrogr/min im Speichel:

N = 18.000
Mittelwert: 2.145
S.D.: 1.073 (50.039 %)
S.E.: 0.253 (11.794 %)

* µg = Mikrogramm
Pr = Probe

Tabelle 7

α_1-ANTITRYPSIN
Abweichung +-3 %

Pr	FE	* µg/ml Konz.Pr	Konz. der Pr	µg/ml Speichel	ml/min	µg/min Speichel
1	28.370	6.9	38.8	0.18	0.30	0.054
2	32.310	8.0	53.2	0.15	0.50	0.076
3	25.790	6.2	53.2	0.12	0.60	0.070
6	28.810	7.0	51.0	0.14	0.58	0.080
8	31.260	7.7	53.2	0.15	0.57	0.083
9	37.670	9.5	79.8	0.12	0.44	0.053
10	20.800	4.8	47.1	0.10	0.30	0.031
11	31.120	7.7	60.0	0.13	0.30	0.039
12	33.120	8.3	60.0	0.14	1.13	0.156
14	51.650	13.5	60.0	0.22	0.50	0.112
15	42.780	11.0	58.2	0.19	0.60	0.113
16	26.150	6.3	60.0	0.11	1.00	0.105
17	29.580	7.3	76.5	0.09	0.75	0.071
18	30.960	7.7	79.8	0.10	0.58	0.056
19	45.100	11.6	79.8	0.15	1.00	0.146
20	41.780	10.7	59.1	0.18		

Mikrogr/ml im Speichel:

N = 16.000
Mittelwert: 0.141
S.D.: 0.037 (26.358 %)
S.E.: 0.009 (6.590 %)

Mikrogr/min im Speichel:

N = 15.000
Mittelwert: 0.083
S.D.: 0.037 (44.623 %)
S.E.: 0.010 (11.522 %)

* µg = Mikrogramm
Pr = Probe

Tabelle 8

TRANSFERRIN

Abweichung +-3 %

Pr	FE	* µg/ml Konz.Pr	Konz. der Pr	µg/ml Speichel	ml/min	µg/min Speichel
1	27.980	1.9	38.8	0.23	0.30	0.070
3	17.510	5.5	53.2	0.10	0.60	0.062
6	26.840	8.7	51.0	0.17	0.58	0.099
9	47.570	15.8	79.8	0.20	0.44	0.087
11	31.280	10.2	60.0	0.17	0.30	0.051
12	33.800	11.1	60.0	0.18	1.13	0.209
14	39.520	13.0	60.0	0.22	0.50	0.109
15	41.000	13.5	58.2	0.23	0.60	0.140
16	19.520	6.2	60.0	0.10	1.00	0.103
17	42.110	13.9	76.5	0.18	0.75	0.136

Mikrogr/ml im Speichel:

N = 10.000
Mittelwert: 0.179
S.D.: 0.046 (25.843 %)
S.E.: 0.015 (8.172 %)

Mikrogr/min im Speichel:

N = 10.000
Mittelwert: 0.107
S.D.: 0.046 (43.375 %)
S.E.: 0.015 (13.716 %)

* µg = Mikrogramm
Pr = Probe

Herrn Professor Dr. med. H. Breuninger und Herrn Dr. rer. nat. W. Giebel möchte ich für die Überlassung des Themas und die gewährte gründliche Unterstützung meinen besten Dank aussprechen.

Mein Dank gilt auch Frau H. Haug vom biochemischen Labor der Hals-Nasen-Ohren-Klinik Tübingen für ihre anfängliche Unterstützung und die wertvollen technischen Hinweise.

L e b e n s l a u f

Am 22. März 1951 wurde ich, Albrecht Bruno Regenbogen, als Sohn des damaligen Lehrers Ernst Regenbogen und seiner Ehefrau Ruth, geborene Rettenmeier, in Horb am Neckar geboren.

Nach dem Besuch der Grundschule und des math. nat. Gymnasiums in Horb am Neckar legte ich im Juni 1970 die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1970 begann ich an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen das Studium der Zahnheilkunde. Dort absolvierte ich das gesamte vorklinische und klinische Studium. Aufgrund des am 10. Dezember 1975 bestandenen Staatsexamens erhielt ich am 22. Dezember 1975 die Bestallungsurkunde als Zahnarzt.

Von Januar bis April 1976 war ich als teilzeitbeschäftigter Assistent in einer Zahnarztpraxis meines Heimatortes tätig. Seit 1. Mai 1976 bin ich Assistenzzahnarzt in der Klinik für Kiefer- und Gesichtschirurgie des Katharinenhospitals Stuttgart, die von Herrn Professor Dr. Dr. H. Schüle geleitet wird.